Aus dem Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. G. Wittmann

CHLOROPLASTENRIBOSOMEN

UNTERSUCHUNGEN MIT PROTEINCHEMISCHEN UND IMMUNOLOGISCHEN METHODEN

Inaugural–Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marius Pascual Raymond Bartsch
aus
Newcastle upon Tyne/England

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546612_0040

Aus dem Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin.
Direktor: Prof. Dr. H.G. Wittmann.

CHLOROPLASTENRIBOSOMEN

Untersuchungen mit proteinchemischen und immunologischen Methoden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marius Pascual Raymond Bartsch
aus
Newcastle upon Tyne/England

Referent: Prof. Dr. med. Georg Stöffler

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Heinz Tiedemann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 26. März 1984

Für Bärbel und meine Mutter,
ohne deren Unterstützung
die Entstehung dieser Arbeit
nicht möglich gewesen wäre.

Inhalt:

1.	Proteinbiosynthese und Ribosomen	Seite 11
1. 1.	Funktion des *E. coli*-Ribosoms	11
1. 2.	Struktur des *E. coli*-Ribosoms	12
1. 3.	Molekulare Evolution des Ribosoms	14
1. 3. 1.	Primärstrukturen der ribosomalen RNS	15
1. 3. 2.	Primärstrukturen der ribosomalen Proteine	16
1. 4.	Problemstellung	17
2.	Chloroplastenribosomen, Transkription und Translation in Chloroplasten	18
2. 1.	Das Chloroplastengenom	18
2. 1. 1.	Gene der ribosomalen RNS und der tRNS	19
2. 1. 2.	Gene der ribosomalen Proteine	19
2. 1. 3.	Gene weiterer Chloroplastenproteine	20
2. 1. 4.	Transkription und Genexpression	21
2. 2.	Struktur und Funktion von Chloroplastenribosomen	21
2. 2. 1.	Struktur der ribosomalen RNS	21
2. 2. 2.	Struktur der ribosomalen Proteine	22
2. 2. 3.	Funktion der Ribosomen	23
2. 3.	Die Endosymbiontenhypothese	24

3. Materialien und Methoden 26

3. 1. Isolierung von Ribosomen 26
3. 1. 1. Isolierung von Ribosomen aus Chloroplasten 26
3. 1. 2. Trennung der Untereinheiten von Chloroplastenribosomen 27
3. 1. 3. Isolierung von Ribosomen des Cytoplasmas 27
3. 1. 4. Isolierung von Ribosomen und der S150-Fraktion aus E. coli 27
3. 1. 5. Trennung von Untereinheiten 28
3. 2. Einfache Charakterisierung von Chloroplasten und Chloroplastenribosomen 28
3. 2. 1. Chlorophyllbestimmung 28
3. 2. 2. Bakterielle Kontamination in Chloroplastenpräparationen 28
3. 2. 3. Photometrische Abschätzung von RNS und Protein in Ribosomenpräparationen 29
3. 2. 4. Quantitative Proteinbestimmung 30
3. 3. Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese 31
3. 4. Extraktion ribosomaler Proteine 31
3. 4. 1. Essigsäureextraktion 31
3. 4. 2. LiCl/Harnstoffextraktion 32
3. 4. 3. Methoden zur Konzentrierung ribosomaler Proteine 32
3. 4. 4. Extraktion von Cpl L12 und anderen Proteinen (Methode nach Hamel et al. 1972) 32
3. 4. 4. 1. Fraktion 1 (Cpl L12) 33
3. 4. 4. 2. Fraktion 2 (basische Proteine) 33
3. 4. 4. 3. Fraktion 3 (ribosomale Corepartikel) 33
3. 5. Ionenaustauschchromatographie 33
3. 5. 1. Anionenaustauschchromatographie, Aufreinigung von Cpl L12 aus Fraktion 1 34
3. 5. 2. Kationenaustauschchromatographie zur Isolierung des basischen Proteins b1 aus Fraktion 2 34
3. 5. 3. HPLC, weitere Auftrennung von Protein b1 35

3. 6.	Gelfiltration	35
3. 6. 1.	Trennung von Proteinen aus Fraktion 3	36
3. 7.	Polyacrylamidgelelektrophoresen	36
3. 7. 1.	Eindimensionale Polyacrylamidgel-elektrophoresen	36
3. 7. 1. 1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen nach Laemmli	36
3. 7. 1. 2.	Harnstoffacrylamidgel nach Kaltschmidt und Wittmann	37
3. 7. 2.	Zweidimensionale Polyacrylamidgel-elektrophoresen	37
3. 7. 2. 1.	Elektrophorese nach Mets und Bogorad	38
3. 7. 2. 2.	Modifikation nach Li und Subramanian	39
3. 7. 2. 3.	Modifikation nach Geyl et al.	39
3. 7. 3.	Färben von Acrylamidgelen	39
3. 7. 3. 1.	Coumassieblaufärbung	39
3. 7. 3. 2.	Toluidinblaufärbung	40
3. 7. 3. 3.	Silberfärbung	40
3. 8.	Immunelektrophorese auf Cellulose-acetatgelen	40
3. 8. 1.	Elektrophorese und Coumassieblaufärbung	40
3. 8. 2.	Immunpräzipitation	41
3. 9.	Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid- und Celluloseacetatgelen auf Nitrocellu-losepapier	41
3. 9. 1.	Transfer	41
3. 9. 2.	Färben auf Proteinen	42
3. 9. 2. 1.	Coumassieblaufärbung	42
3. 9. 2. 2.	Reversible Toluidinblaufärbung	42
3. 9. 2. 3.	Silberfärbung	42
3. 10.	Immunabsorption auf Nitrocellulosepapier und Antikörpernachweis mit konjugierten Antikörpern	43
3. 11.	Konjugierte Antikörper	43
3. 11. 1.	Fluoresceinkonjugierte Antikörper	43
3. 11. 2.	Peroxydasekonjugierte Antikörper	44
3. 12.	Radiale Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	44

3. 13.	Antiseren gegen Ribosomen und ribosomale Proteine	45
3. 14.	Aminosäurezusammensetzungen	45
3. 14. 1.	Totalhydrolysen	45
3. 14. 2.	Totalhydrolysen nach Oxydation mit Perameisensäure	46
3. 14. 3.	Bestimmung des Tryptophangehalts durch UV-Spektrometrie	46
3. 15.	Enzymatische Spaltungen zur Bestimmung der Primärstruktur von Cpl L12	47
3. 15. 1.	Spaltungen am intakten Protein	47
3. 15. 1. 1.	Spaltungen mit TPCK-Trypsin	47
3. 15. 1. 2.	Spaltungen mit Chymotrypsin	47
3. 15. 1. 3.	Spaltungen mit Pepsin	47
3. 15. 1. 4.	Spaltungen mit Staphylococcus aureus-Protease	48
3. 15. 1. 5.	Carboxypeptidase A	48
3. 15. 2.	Nachspaltungen der großen tryptischen Peptide	48
3. 15. 2. 1.	Nachspaltung mit Thermolysin	48
3. 15. 2. 2.	Nachspaltung mit Trypsin	49
3. 15. 2. 3.	Nachspaltung mit Chymotrypsin	49
3. 15. 2. 4.	Nachspaltung mit Staphylococcus aureus-Protease	49
3. 16.	Peptidtrennungen auf Dünnschichtplatten	49
3. 16. 1.	Dünnschichtfingerprinttechnik	49
3. 16. 2.	Nachweis von Peptiden auf Dünnschichtplatten	50
3. 16. 2. 1.	Nachweis mit Fluorescamin	50
3. 16. 2. 2.	Nachweis mit Ninhydrin	50
3. 16. 2. 3.	Tryptophannachweis	51
3. 16. 3.	Elution der Peptide aus Dünnschichtplatten	51
3. 17.	Gelfiltration zur Isolierung der großen tryptischen Peptide	51
3. 18.	Mikrosequenzierung mit DABITC/PITC-Doppelkupplungsmethode	52
3. 18. 1.	Abbau der N-terminalen Aminosäuren mit DABITC/PITC	53

3. 18. 2.	Nachweis der DAB-Aminosäuren	54
3. 19.	Manuelle Festphasensequenzierung	55
3. 20.	Sekundärstrukturvorhersage von Protein Cpl L12	55
4.	Isolierung und Charakterisierung von Ribosomen aus Spinat	56
4. 1.	Chloroplastenpräparation, Ausbeute, Chlorophyllbestimmung und bakterielle Kontamination	56
4. 2.	Chloroplastenribosomen	57
4. 2. 1.	Ausbeute, präparierte Menge	57
4. 2. 2.	Kontamination mit nicht-ribosomalen Proteinen	58
4. 2. 3.	Kontamination mit 80S-Ribosomen	59
4. 2. 4.	Trennung der Untereinheiten	60
4. 3.	Isolierung der cytoplasmatischen Ribosomen	61
4. 4.	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophoresen von Proteinen aus Chloroplastenribosomen und deren Untereinheiten	65
4. 5.	Aminosäurezusammensetzungen von Spinatribosomen	66
4. 6.	Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese mit Chloroplastenribosomen	67
5.	Identifizierung und Isolierung des Proteins Cpl L12 aus Spinatchloroplasten	68
5. 1.	Kreuzreaktion zwischen *E. coli*-L7/12 und einem Protein aus Ribosomen der Spinatchloroplasten	68
5. 2.	Identifizierung von Cpl L12	70
5. 3.	Isolierung von Cpl L12	70

5. 4. Aminosäurezusammensetzung von Cpl L12 74
5. 5. UV-Absorptionsspektrum von Cpl L12 76
5. 6. Stöchiometrie von Cpl L12 77

6. Primärstruktur von Cpl L12 78

6. 1. Strategie zur Aufklärung der Primärstruktur 78
6. 2. Bestimmung des C-Terminus mit Carboxypeptidase 79
6. 3. Enzymatische Spaltungen des intakten Proteins 80
6. 3. 1. Spaltung mit Trypsin 80
6. 3. 2. Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease 84
6. 3. 3. Spaltung mit Pepsin 84
6. 3. 4. Spaltung mit Chymotrypsin 87
6. 4. Enzymatische Spaltungen der großen tryptischen Peptide
6. 4. 1. Enzymatische Spaltungen von Peptid T1 87
6. 4. 1. 1. Enzymatische Spaltung von Peptid T1 mit Thermolysin 87
6. 4. 1. 2. Enzymatische Nachspaltung des Peptids T1 mit Trypsin 89
6. 4. 2. Enzymatische Spaltungen von Peptid T3 89
6. 4. 2. 1. Enzymatische Spaltung von Peptid T3 mit Chymotrypsin 89
6. 4. 2. 2. Enzymatische Spaltung von Peptid T3 mit Thermolysin 93
6. 4. 2. 3. Enzymatische Spaltung von Peptid T3 mit Staphylococcus aureus-Protease 93
6. 5. Eigenschaften und Vergleich von Cpl L12 mit entsprechenden ribosomalen Proteinen anderer Organismen 93
6. 5. 1. Charakteristik der Primärstruktur 93
6. 5. 2. Vergleich der Primärstruktur von Cpl L12 mit den ribosomalen "A-Proteinen" aus anderen Organismen 94

6. 5. 3. Sekundärstruktur und Tertiärstruktur von Cpl L12 und deren Vergleich mit E. coli-L12 99
6. 6. Kritik der angewendeten Methoden 102

7. Isolierung weiterer ribosomaler Proteine aus Spinatchloroplasten 104

7. 1. Trennung ribosomaler Proteine aus Fraktion 3 104
7. 2. Isolierung und Charakterisierung der Proteine aus Fraktion 2 107

8. Immunologische Untersuchungen an Proteinen der Chloroplastenribosomen 112

8. 1. Immundoppeldiffusion in Agarosegelen und Immunpräzipitation auf Celluloseacetatgelen 113
8. 2. Immunreaktion auf Nitrocellulosepapier 114
8. 2. 1. Empfindlichkeit, Spezifität und notwendige Kontrollen 114
8. 2. 2. Vorgehensweise zur Demonstration von Kreuzreaktionen zwischen ribosomalen Proteinen aus Chloroplasten und E. coli 116
8. 3. Ergebnisse und Diskussion 118

9. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick 132

9. 1. Zusammenfassung 132
9. 2. Die Verwandtschaft der ribosomalen "A-Proteine" aus Prokaryonten, Eukaryonten und Zellorganellen 133

9. 3. Strukturähnlichkeiten der Ribosomen aus Chloroplasten höherer Pflanzen und *E. coli* 136

9. 4. Ausblick 139

Literaturliste 141

Danksagung 153

Lebenslauf 154

1. Proteinbiosynthese und Ribosomen

Alles Leben wird durch intrazelluläre Vorgänge gesteuert, erhalten und vermehrt. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen von Replikation (DNS→DNS), Transskription (DNS→RNS) und Translation (RNS→Protein) ist eine der herausragenden und faszinierenden Leistungen der letzten dreißig Jahre.

Die Translation oder Proteinbiosynthese führt zur Expression genetischer Information und verläuft bei allen Lebewesen prinzipiell gleich. Sie setzt außer der Existenz von Ribosomen ein koordiniertes Zusammenspiel von mehr als hundert Makromolekülen voraus, u.a. mRNS, tRNS, Aminosäuren, Aminoacyl-tRNS-Synthetasen, Nukleotidtriphosphate und Translationsfaktoren. Die Translation (RNS→Protein) wird durch tRNS-Moleküle vermittelt, die Kodons (Nukleotidtripletts) erkennen können und mit entsprechenden Aminosäuren beladen sind. Kodons der mRNS bestimmen durch Basenpaarung mit Antikodons der tRNS die Aminosäuresequenz des entstehenden Polypeptids (Protein). Ort der Proteinbiosynthese ist das Ribosom.

1. 1. Funktion des *E. coli*-Ribosoms

Am eingehendsten untersucht wurde der Translationsapparat von *E. coli*. Das daraus entwickelte operative Modell unterscheidet drei Phasen der Proteinbiosynthese am Ribosom: Initiation, Elongation und Termination.

Zur Initiation bildet sich aus mRNS, Initiator-tRNS und der kleinen 30S-Untereinheit des Ribosoms ein ternärer Initiationskomplex. Hierbei spielt das Startkodon AUG oder GUG und eine Basenpaarung zwischen mRNS und 3'-Terminus der 16S-RNS (Shine-

Dalgarno-Sequenz)eine wichtige Rolle. An diesen 30S-Initiationskomplex lagert sich die große 50S-Untereinheit des Ribosoms und bildet den 70S-Initiationskomplex.

Die nächste Phase der Proteinbiosynthese wird als Elongationsphase bezeichnet. In der Elongationsphase wiederholen sich jeweils: Bindung der kodonspezifischen Aminoacyl-tRNS in die sog. "A-Site" des Ribosoms, Ausbildung einer Peptidbindung und Translokation der entstandenen Peptidyl-tRNS und der mRNS aus der A-Site in die P-Site des Ribosoms. Hierdurch wird die Peptidkette am C-terminalen Ende jeweils um eine Aminosäure verlängert und die A-Site für einen neuen Elongationszyklus frei.

Die Proteinbiosynthese wird durch die Terminationsfaktoren RF1 und RF2, die die Stopkodons UAA, UGA und UAG erkennen, beendet. Sie bewirken die Freisetzung der synthetisierten Peptidkette durch Hydrolyse der Bindung mit der letzten tRNS.

Zur Bildung des Initiationskomplexes werden drei Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3 benötigt. Zur Bindung von Aminoacyl-tRNS in die A-Site ist der Elongationsfaktor EF-TU und zur Translokation der Elongationsfaktor EF-G notwendig. Die drei Schritte verbrauchen jeweils die Energie aus der Spaltung zweier Moleküle GTP.

Proteinbiosynthese in Eukaryonten verläuft ähnlich, im Detail jedoch komplizierter. Die 80S-Ribosomen der Eukaryonten sind größer als die 70S-Ribosomen von Bakterien und besitzen mehr Proteine. Der Initiationsfaktor eIF2 wird durch ein Proteinkinasenkaskadensystem reguliert.

Antibiotika und Toxine besitzen Bindungsstellen an Ribosomen und können einzelne Schritte der Proteinbiosynthese selektiv hemmen. Spezifität der Bindungsstellen und Funktionshemmung bestimmter Antibiotika sind in Eubakterien und Eukaryonten verschieden.

1. 2. Struktur des E. coli-Ribosoms

Das 70S-Ribosom aus E. coli besteht aus den schon oben erwähnten zwei Untereinheiten (der kleinen 30S- und der großen 50S-Untereinheit). Es hat ein Molekulargewicht von $2,3 \times 10^6$

Dalton und einen Durchmesser von ca. 250 Å. Zwei Drittel seiner Masse besteht aus RNS, ein Drittel aus Protein. Die Primärstrukturen der drei RNS-Moleküle (23S-RNS mit 2904 Nukleotiden, 16S-RNS mit 1542 Nukleotiden und 5S-RNS mit 120 Nukleotiden) und der 52 verschiedenen ribosomalen Proteine sind vollständig aufgeklärt worden. In Tabelle 1 sind die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine von E. coli zusammengestellt.

Tab. 1: Anzahl der Aminosäurereste und Molekulargewichte der ribosomalen (und verwandter) Proteine aus E. coli (nach Wittmann 1982).

Protein	Aminosäure-reste	Molekular-gewicht	Protein	Aminosäure-reste	Molekular-gewicht
S1	557	61159	L10	165	17737
S2	240	26613	L11	141	14874
S3	232	25852	L12	120	12178
S4	203	23137	L13	142	16019
S5	166	17515	L14	123	13541
S6	135	15704	L15	144	14981
S7K	177	19732	L16	136	15296
S7B	153	17131	L17	127	14364
S8	129	13996	L18	117	12770
S9	128	14569	L19	114	13002
S10	103	11736	L20	117	13366
S11	128	13728	L21	103	11565
S12	123	13606	L22	110	12227
S13	117	12968	L23	99	11013
S14	97	11063	L24	103	11185
S15	87	10001	L25	94	10694
S16	82	9191	L26=S20	86	9553
S17	83	9573	L27	84	8993
S18	74	8896	L28	77	8875
S19	91	10299	L29	63	7274
S20	86	9553	L30	58	6411
S21	70	8369	L31	62	6971
L1	233	24599	L32	56	6315
L2	269	29416	L33	54	6255
L3	209	22258	L34	46	5381
L4	201	22087	IF-1	71	8119
L5	178	20171	IF-3	181	20695
L6	176	18832	EF-Tu	393	43225
L7	120	12220	NS1	90	9226
L9	147	15531	NS2	90	9535

Ribosomen entstehen in vivo aus ihren Einzelkomponenten durch einen "self-assembly-Prozeß". Es ist gelungen, in vitro funktionstüchtige Ribosomen durch Rekonstitution von Untereinheiten aus isolierter RNS und isolierten Proteinen zu erhalten.

Zur Aufklärung der Struktur des E. coli-Ribosoms wurden u.a. folgende Methoden angewandt: Immunelektronenmikroskopie, Neutronenstreuung oder Fluoreszensspektroskopie nach Rekonstitution von Ribosomen mit deuterierten oder fluoreszensmarkierten Komponenten, Untersuchung intermolekularer Verknüpfungen mit bifunktionellen Reagenzien, Untersuchung der RNS nach partieller Verdauung von RNS-Proteinkomplexen mit Nukleasen und Kristallisation von Ribosomen und isolierten Proteinen. Die Bestimmung der Primärstruktur der RNS-Moleküle ermöglichte es, verläßliche Sekundärstrukturmodelle für dieselben aufzustellen. Mithilfe dieser Methoden wurde ein detailliertes topographisches Modell des Ribosoms entworfen. Übersichtsarbeiten verschiedener Autoren zur Struktur und Funktion von Ribosomen finden sich in den Büchern, die von Nomura et al. (1974), Weissbach und Pestka (1977), Chambliss et al. (1980), Osawa et al. (1980) herausgegeben worden sind. Weitere Übersichtsartikel zur Struktur von Ribosomen finden sich bei Wool (1979), Siekewitz und Zamecnik (1981), Liljas (1982) und Wittmann (1982), Stöffler und Stöffler-Meilicke (1983), zum Funktionsmodell bei Hunt (1980), Clark (1980), Caskey (1980) und Nierhaus (1983).

1. 3. Molekulare Evolution des Ribosoms

Durch Vergleich von Primärstrukturen von RNS- und Proteinmolekülen kann der Verwandtschaftsgrad verschiedener Organismen ermittelt werden. Der Austausch von Nukleotiden oder Aminosäuren in ribosomaler RNS oder ribosomalen Proteinen findet in der Evolution hinreichend langsam statt, daß auch sehr entfernte Verwandtschaften nachgewiesen werden können . In Tabelle 2 sind typische Geschwindigkeiten angegeben, mit denen Nukleotide oder Aminosäuren in bestimmten Molekülen ausgetauscht werden. Ribosomale Komponenten gehören zu den Molekülen, bei denen auch nach mehr als 10^9 Jahren eine erkennbare Homologie zwischen zwei Moleklü-

len zu beobachten ist.

Tab. 2: Aminosäure- und Nukleotidsubstitutionsgeschwindigkeit ribosomaler und anderer Proteine (nach Osawa und Hori 1980).

Protein	Aminosäure- oder Nukleotid-substitutionsgeschwindigkeit $\times 10^{-10}$/Position/Jahr
Bakterielle ribosomale Proteine (N-Term.)	3
Ribosomales "A-Protein" (eubakterieller Typ)	3
Ribosomales "A-Protein" (eukaryotischer Typ, Pos. 1-75)	3
Histon IV	0.06
Glyceraldehyd 3-PO_4 dehydrogenase	2
Cytochrom C	3
Insulin	4
Trypsinogen	5
Melanotropin ß	7
Gastrin	8
Lysozym (von Tieren)	10
Myoglobulin	13
Hämoglobin	14
Lactalbumin	25
Immunoglobuline	32
Pankreas-RNase	33
Wachstumshormon	37
Fibrinopeptide	90

1. 3. 1. Primärstrukturen der ribosomalen RNS

Ribosomale RNS-Moleküle aus allen Organismen sind einander homolog. Aus Bild 1 ist zu ersehen, wie die verschiedenen RNS-

Moleküle aus Cytoplasma, Chloroplasten und Mitochondrien von Eukaryonten eindeutig den drei RNS-Molekülen der Ribosomen aus E. coli zugeordnet werden können. Aufgrund vergleichender Strukturuntersuchungen von ribosomaler RNS (T1-Katalogisierung) wurde die frühe Entwicklung der Eubakterien, Archaebakterien und Eukaryonten aus drei verschiedenen Reichen postuliert (Woese und Fox 1977).

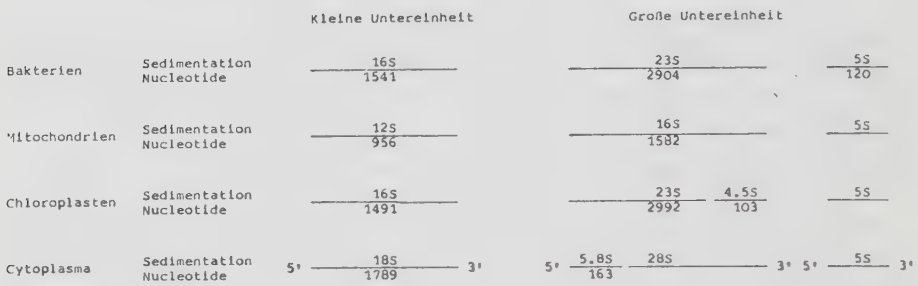


Bild 1: Zuordnung der verschiedenen ribosomalen RNS-Moleküle aus Bakterien, Mitochondrien, Chloroplasten und Cytoplasma. Chloroplasten-4,5S-RNS ist homolog zum 3'-Ende der bakteriellen 23S-RNS (McKay 1981). Cytoplasmatische 5,8S-RNS ist homolog zum 5'-Ende der 23S-RNS (Walker 1980). Die Anzahl der Nukleotide wurde folgenden Quellen entnommen: E. coli-16S-RNS (Brosius 1978), E. coli-23S-RNS (Brosius et al. 1980), E. coli-5S-RNS (Brownlee et al. 1968). Maus-Mitochondrien-12S-RNS und -16S-RNS (Van Etten et al. 1980). Mais-Chloroplasten-16S-RNS (Schwarz und Kössel 1980), -23S-RNS (Edwards und Kössel 1981). Tabakchloroplasten-4,5S-RNS(Takaiva und Sugiura 1980). Hefe-18S-RNS (Rubtsov et al. 1980). Bild mod. nach Liljas (1982).

1. 3. 2. Primärstrukturen der ribosomalen Proteine

Einander entsprechende ribosomale Proteine in verschiedenen Eubakterien, Eukaryonten oder Archaebakterien konnten aufgrund von Primärstrukturen jeweils innerhalb einer Gruppe zugeordnet werden (Matheson et al. 1980, Osawa und Hori 1980, Wittmann-Liebold 1980). Beim Vergleich der ribosomalen Proteine aus Eubakterien und Eukaryonten konnte dies bisher nicht überzeugend gezeigt werden (Wittmann-Liebold 1980). Für einige ribosomale

Proteine aus Archaebakterien und Eukaryonten konnte jedoch demonstriert werden, daß sie einander entsprechen (Otaka et al. 1982, Matheson et al. 1980). Über die Primärstrukturen der ribosomalen Proteine aus Mitochondrien und Chloroplasten ist nichts bekannt (siehe nächstes Kapitel).

1. 4. Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ribosomale Proteine aus Chloroplasten zu charakterisieren. Es wurden große Mengen Ribosomen aus Chloroplasten isoliert (siehe Kapitel 4) und erstmals die Primärstruktur eines Proteins aus Chloroplastenribosomen aufgeklärt (Kapitel 5 und 6). Weitere Proteine wurden isoliert und vorfraktioniert, um sie für spätere Untersuchungen zu verwenden (Kapitel 7). Mit einer empfindlichen Methode wurde untersucht, ob Proteine der Chloroplastenribosomen immunologisch mit Proteinen aus E. coli verwandt sind (Kapitel 8).

Im folgenden Kapitel ist eine zum Verständnis von Chloroplasten und Chloroplastenribosomen notwendige Literaturübersicht gegeben.

2. Chloroplastenribosomen, Transkription und Translation in Chloroplasten

Pflanzenzellen besitzen drei Arten Ribosomen: 80S-Ribosomen im freien Cytoplasma und zwei verschiedene Arten 70S-Ribosomen in den Plastiden (Chloroplasten) und in den Mitochondrien (Lyttleton 1962, Vasconcelos et al. 1971, Boynton et al. 1980). Chloroplastenribosomen sind Teil eines kompletten Transkriptions- und Translationsapparates. Die Ribosomen der Organellen synthetisieren eine kleine Gruppe organellenspezifischer Proteine, die durch DNS der Organellen kodiert werden. Bei Sistieren der Proteinbiosynthese in Chloroplasten kommt es zu einer Blockade von Elektronentransport, Photophosphorylierung und CO_2-Fixation, da jeweils einige der für diese Prozesse wichtigen Proteine von Chloroplastenribosomen synthetisiert werden.

Mengenmäßig trägt die Proteinbiosynthese von Chloroplasten einen ganz beachtlichen Teil zum Gesamtprotein der photosynthetischen Zellen bei. Eines der Produkte von Chloroplastenribosomen ist die große Untereinheit (LS) von Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase, dem Enzym, das den ersten Schritt bei der CO_2-Fixierung, die Übertragung von CO_2 auf Ribulosebisphosphat, katalysiert. In grünen Blättern kann Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase die Hälfte des Gesamtproteins ausmachen.

Im folgenden Text wird eine kurze Darstellung des Transkriptions- und Translationsapparats von Chloroplasten gegeben. Ausführliche Übersichtsarbeiten finden sich bei Ellis (1976, 1977), Boynton et al. (1980), Bogorad (1981), Gray und Doolittle (1982).

2. 1. Das Chloroplastengenom

Chloroplasten höherer Pflanzen enthalten wie Bakterien eine ringförmige DNS von ca. 40 μm Länge (12o-150000 Basenpaare, Molekulargewicht 8-10 x 10^7 Dalton, Bedbrook und Kolodner 1979). Diese Kapazität reicht aus, um 125 Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 50000 Dalton zu kodieren. Chloroplasten-DNS ist nicht mit histonähnlichen Proteinen assoziiert, enthält wenig 5-Methylcytosin und keine hochrepetitiven Sequenzen. In proteinkodierenden Genen wurden im Gegensatz zu einigen Genen für tRNS-Moleküle (s.u.) bisher keine Introns gefunden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Autoradiogramme von Chloroplasten-DNS zeigten, daß diese polyploid (10-60) ist (Ellis 1976, Bogorad 1981). Gene, die in Chloroplasten kodiert sind, haben einen maternen Erbgang, der wegen der Multiplizität der Chloroplasten-DNS verzögert exprimiert werden kann.

2. 1. 1. Gene der ribosomalen RNS und der tRNS

Das Chloroplastengenom enthält die Gene für die ribosomale RNS, die wie bei E. coli ein Operon zusammen mit zwei Genen für tRNS-Moleküle bilden. Bei fast allen untersuchten Arten (u.a. Mais, Spinat, Tabak, Chlamydomonas) sind jeweils zwei solcher Einheiten mit entgegengesetzter Orientierung auf der Chloroplasten-DNS weit voneinander getrennt angeordnet (siehe Übersichtsarbeit Gray und Doolittle 1982).

Viele, jedoch nicht alle Gene für chloroplastenspezifische tRNS wurden auf dem Organellengenom lokalisiert. Einige Gene für tRNS-Moleküle enthalten große Introns. Die $tRNS^{Ile}$ enthält ein Intron mit 949 Basen (Koch et al. 1981).

Gene für ribosomale Proteine und Translationsfaktoren liegen teilweise auf dem Plastidgenom, teilweise auf dem Kerngenom.

2. 1. 2. Gene der ribosomalen Proteine

Mit verschiedenen Ansätzen wurde versucht, Gene für ribosomale Proteine zu lokalisieren. Durch selektive Hemmung der Proteinbiosynthese in Chloroplasten oder im Cytoplasma konnte dargelegt werden, daß mindestens neun ribosomale Proteine in Chlo-

roplasten synthetisiert werden müssen, während mindestens zwölf ribosomale Proteine im freien Cytoplasma entstehen (Freysinnet 1978).

Ein anderer Versuch, die Kompartimente für die Gene der ribosomalen Proteine zu bestimmen, wurde durch Lokalisation veränderter Gene in antibiotikaresistenten (u.a. Streptomycin und Erythromycin) Mutanten von Chlamydomonas unternommen (Boynton 1980). Von Davidson et al. (1974) wurde gezeigt, daß das Ery-M1-Gen des Kerngenoms (Erythromycinresistenz) Protein LC6 kodiert.

Durch Inkubation und Markierung von intakten Chloroplasten mit radioaktiven Aminosäuren wurden etliche ribosomale Proteine bestimmt, deren Synthese in Chloroplasten stattfindet (Eneas-Filho 1981).

Kürzlich wurde ein in-vitro-System mit Chloroplastenlysat beschrieben, mit dem es möglich ist, nach Unterdrückung von endogener Aktivität isolierte mRNS zu übersetzen (Camerino et al. 1982). Mit diesem System sollte es möglich sein, Genprodukte der Chloroplasten-DNS zu identifizieren.

2. 1. 3. Gene weiterer Chloroplastenproteine

Auch die Proteine des Photosyntheseapparates werden z.T. vom Chloroplastengenom und z.T. vom Kerngenom kodiert. Die große Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase wird im Chloroplast synthetisiert, während die kleine Untereinheit im freien Cytoplasma als Vorstufe synthetisiert wird.

Die Verteilung von Genen multimerer Komponenten in Chloroplasten ist nach Bogorad (1975) ein generelles Regulationsprinzip zur Kontrolle der semiautonomen Organelle.

Das Verteilungsmuster der Gene muß in höheren Pflanzen und Algen nicht notwendigerweise identisch sein. So wurde publiziert, daß die Translationsfaktoren EF-G und EF-Tu in Spinat und Chlorella Organellenprodukte sind (Ciferri et al. 1979), die Faktoren in Euglena jedoch im Kerngenom kodiert sind (Fox et al. 1980).

2. 1. 4. Transkription und Genexpression

Chloroplasten besitzen eine DNS-abhängige RNS-Polymerase und in den Genen Promotorregionen, die denen der Eubakterien ähneln. Im Gegensatz zur mRNS des Cytoplasmas wird die mRNS von Chloroplasten und Eubakterien nicht massiv 3'polyadenyliert (Gray und Doolittle 1982).

Gene von Chloroplasten können in Eubakterien exprimiert werden. So wurde bspw. das Gen für die große Untereinheit von Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase nach Klonierung in E. coli mit seinem eigenen Promotor exprimiert (Gatenby et al. 1981).

2. 2. Struktur und Funktion von Chloroplastenribosomen

Wie bereits oben erwähnt, sedimentieren Chloroplastenribosomen wie die der Eukaryonten mit 70S. Sie dissoziieren unter ähnlichen Bedingungen wie Untereinheiten der Ribosomen aus Eubakterien. Auch Größe und elektrophoretische Mobilität sind ähnlich wie bei bakteriellen Ribosomen. Eukaryontische 80S-Ribosomen hingegen sind größer und haben eine geringere elektrophoretische Mobilität. Chloroplastenribosomen können bis zu 50% der Ribosomen in photosynthetischen Zellen ausmachen (Boynton 1980).

2. 2. 1. Struktur der ribosomalen RNS

Chloroplastenribosomen besitzen vier Moleküle RNS. In der großen Untereinheit findet man 4,5S-, 5S- und 23S-RNS, in der kleinen Untereinheit 16S-RNS. Die Primärstrukturen der vier RNS-Moleküle verschiedener Pflanzen sind aufgeklärt worden. Die Homologie der 16S-RNS-Moleküle aus Maischloroplasten und E. coli beträgt 74% (Schwarz und Kössel 1981) und der 23S-RNS 70% (Edwards und Kössel 1981). Die 4,5S-RNS ist homolog zum 3'-Ende der 23S-RNS aus E. coli (McKay 1981). Die Homologie der 5S-RNS

aus Spinatchloroplasten und E. coli ist mit 52% etwas geringer als die der großen RNS-Moleküle (Pieler et al. 1983). Die Homologie zu den ribosomalen RNS-Molekülen der Eukaryonten ist für alle vier RNS-Moleküle aus Chloroplasten niedriger als zu Prokaryonten. Die Ähnlichkeit zeigt sich auch beim Vergleich der Sekundärstrukturmodelle für die RNS-Moleküle (Glotz et al. 1981). Diese Modelle ergaben, daß die Sekundärstruktur oft besser erhalten geblieben ist als die Primärstruktur. Das unterstreicht die hohe Zahl kompensierender Austausche (Basenpaarung erhaltende Substitutionen, z.B. A-U durch C-G). Beim Vergleich von Chloroplasten-23S- und E. coli-23S-RNS wurden mehr als 450 kompensierende Austausche gefunden (E. coli-23S besteht aus 2904 Nukleotiden mit ca. 50% Basenpaarung, also ca. 750 Basenpaaren).

2. 2. 2. Struktur der ribosomalen Proteine

Im Gegensatz zu den verfügbaren Daten über ribosomale RNS von Chloroplasten ist relativ wenig über die ribosomalen Proteine aus Chloroplasten bekannt. Kein Protein wurde bisher in genügender Menge isoliert, um Strukturuntersuchungen vornehmen oder sie zur Gewinnung spezifischer Antiseren verwenden zu können (Boynton 1980).

Proteine aus Ribosomen von Chloroplasten höherer Pflanzen wurden aus Spinat (Mache et al. 1980), Erbsen (Eneas-Filho et al. 1981) und aus Tabak (Capel und Bourque 1982) mit zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert. Die Anzahl ribosomaler Proteine (50-60) und das Vorhandensein etlicher saurer Proteine ist in Ribosomen von Chloroplasten und Eubakterien ähnlich. Ob die ribosomalen Proteine, deren Synthese im Cytoplasma stattfindet, Vorstufen besitzen, die den Transport durch die Chloroplastenmembran erleichtern, ist nicht bekannt.

Immunologische Untersuchungen ergaben keine Kreuzreaktionen zwischen ribosomalen Proteinen aus Chloroplasten höherer Pflanzen und Eubakterien (Gualerzi et al. 1973). Publiziert wurde jedoch, daß Antiseren gegen ribosomale Proteine der 30S-Untereinheit aus Chloroplasten von Chlamydomonas mit ribosomalen Proteinen aus E. coli, nicht jedoch mit Proteinen des Cytoplasmas

reagierten (Schneemann und Surzycki 1979).

2. 2. 3. Funktion der Ribosomen

Proteinbiosynthese in Chloroplasten verläuft sehr ähnlich wie in Prokaryonten. Initiator-tRNS ist wie in Eubakterien N-Formylmethionyl-tRNS (Boynton 1980). Die 16S-RNS von Chloroplasten besitzt am 3'-Ende die für die Initiation in Eubakterien wichtige pyrimidinreiche Shine-Dalgarno-Sequenz(Schwarz und Kössel 1980). Eine zu dieser Sequenz komplementäre Sequenz existiert auf der mRNS für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase. 80S-Ribosomen der Eukaryonten verwenden zur Initiation der Proteinbiosynthese nicht N-formylierte tRNS und besitzen keine Shine-Dalgarno-Sequenz (siehe Übersichtsarbeit Gray und Doolittle 1982).

Translationsfaktoren, die EF-G und EF-Tu von E. coli entsprechen, kommen in allen Organismen (Amons et al. 1983), auch in Chloroplasten, vor und scheinen einen gemeinsamen genetischen Ursprung zu haben. Primärstrukturen der Translationsfaktoren von Chloroplasten sind jedoch nicht bekannt.

Chloroplastenribosomen reagieren nicht auf Antibiotika, die die Proteinbiosynthese von cytoplasmatischen Ribosomen hemmen (Cycloheximid und Anisomycin). Sie sprechen dagegen praktisch auf alle Antibiotika an, die die Proteinbiosynthese in Eubakterien hemmen (Chloramphenicol, Aminoglycoside und Makrolide). Streptomycin verursacht in Chloroplasten wie in Bakterien den gleichen Lesefehler bei der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese (Isoleucin statt Phenylalanin). Die spezifischen Bindungsstellen der wirksamen Antibiotika an Chloroplasten- und Eubakterienribosomen befinden sich jeweils auf derselben Untereinheit (Boynton et al. 1980).

Die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit von Chloroplastenribosomen und Ribosomen aus Eubakterien wird durch Untersuchungen an hybriden Ribosomen unterstrichen. Beide möglichen Kombinationen aus Untereinheiten von E. coli und Chloroplastenribosomen sind in der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese aktiv (Grivell und Walg 1972).

2. 3. Die Endosymbiontenhypothese

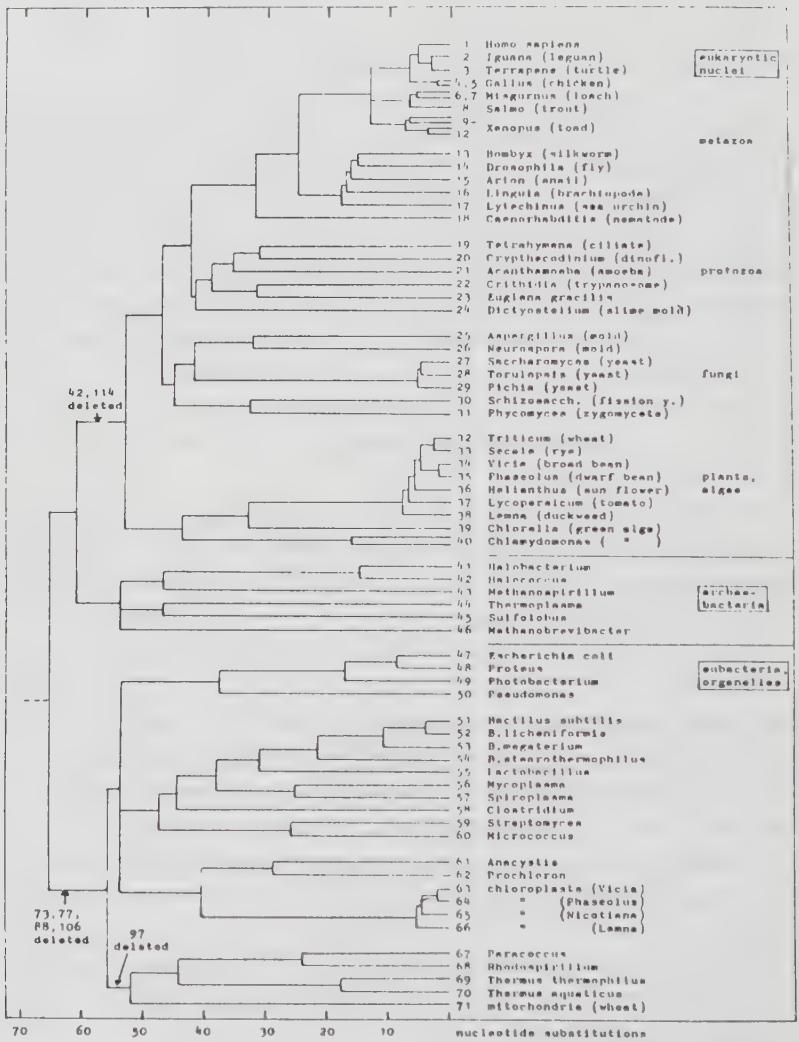


Bild 2: Phylogenetischer Baum, der nach Analyse der Primärstrukturen der ribosomalen 5S-RNS-Moleküle konstruiert wurde. Die Teilungspunkte ergeben sich aus der Anzahl der Nukleotidsubstitutionen in den verglichenen Sequenzen oder Protosequen-

zen. Für die Bestimmung der frühen Teilungspunkte wurden gruppenspezifische Merkmale (Deletionen) der verglichenen Moleküle berücksichtigt (nach Küntzel et al. 1983).

Die große Ähnlichkeit der Genorganisation und Molekularbiologie, die Primärstrukturen von Cytochrom C, von Ferredoxin und der ribosomalen RNS-Moleküle weisen darauf hin, daß die Zellorganellen (Chloroplasten und Mitochondrien, auf die hier nicht näher eingegangen wurde) mit den Eubakterien näher verwandt sind, als die frühe Teilung der eubakteriellen Linie von der eukaryotischen erwarten läßt. Diese Beobachtung hat zur vielzitierten "Endosymbiontenhypothese" geführt, die postuliert, daß die Zellorganellen zu einem späteren Zeitpunkt in einen Vorläufer (Progenoten) der heutigen Eukaryonten eingewandert sind. Die Teilung der bakteriellen Linie von der eukaryotischen ereignete sich nach Osawa und Hori (1980) vor $1,8 \times 10^9$ Jahren. Die postulierte Immigration von Organellen in einen Vorläufer der heutigen Eukaryonten fand nach Osawa und Hori deutlich später, nämlich vor $1,2 \times 10^9$ Jahren statt. Für Chloroplasten gilt die Entstehung aus photosynthesetreibenden Prokaryonten (heutige Cyanobakterien, Prochloron) als gesichert. Die Endosymbiontenhypothese wird jedoch kontrovers diskutiert (Gray und Doolittle 1982). Bild 2 zeigt einen Stammbaum, der aus Primär- und Sekundärstrukturen der ribosomalen 5S-RNS abgeleitet wurde. Chloroplasten sind mit den photosynthesetreibenden Bakterien Anacystis nidulans und Prochloron in einer Gruppe aufgeführt.

3. Materialien und Methoden

3. 1. Isolierung von Ribosomen

3. 1. 1. Isolierung von Ribosomen aus Chloroplasten

Zur Isolierung intakter Chloroplasten wurden die von Reeves und Hall (1980) und Walker (1980) beschriebenen Methoden modifiziert und vereinfacht.

Abhängig von der Jahreszeit wurde italienischer Feldspinat oder deutscher Blattspinat (Spinacia oleracea) vom Fruchthof Berlin erworben. Die Blätter wurden am Blattansatz von ihren Strünken befreit, dreimal gründlich mit Leitungswasser und dann mit deionisiertem Wasser gespült. Sie wurden zweihundertgrammweise in einem Mixer (Waring Blender) in 400 ml Puffer 2 x 10 Sek. homogenisiert und zur Abtrennung größerer Blattfragmente durch zwei und acht Lagen Verbandsmull filtriert. Das Filtrat wurde bei 1200 x g 15 Min. in einem Sorvall GS 3-Rotor zentrifugiert und das Sediment (überwiegend Chloroplasten) in Puffer gewaschen und rezentrifugiert. Homogenisierung und Resuspension wurden in Puffer A (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 7 mM Mercaptoäthanol) mit 0,7 und 0,4 M Sorbitol als Osmotikum durchgeführt. Zur Lyse wurden die Chloroplasten in Puffer A mit 2% Triton X 100 suspendiert (1 l/100 g Chloroplastensediment), 30 Min. gerührt und bei 26000 x g 30 Min. zentrifugiert. Der tiefgrüne Überstand (Chloroplasten-S30) wurde über eine 1 M Rohrzucker in Puffer A pipettiert und in einem Beckman 45 Ti-Rotor bei 86000 x g 17 Std. zentrifugiert. Das Ribosomensediment wurde in einem kleinen Volumen Puffer A mit 10% Glycerin gelöst. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 26000 x g in 15 Min. entfernt. Bei der Isolierung

von Ribosomen aus anderen Pflanzen wurde dieselbe Methode verwendet.

3. 1. 2. Trennung der Untereinheiten von Chloroplastenribosomen

Zur Präparation von Untereinheiten wurden 0,5 g Chloroplastenribosomen gegen Puffer B (10 mM K-Phosphat pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$) dialysiert und durch Zonalzentrifugation in einem Gradienten mit 10-30% Sucrose in Puffer B getrennt (Beckman Typ 15-Rotor, 23000 UpM, 17 Std., 4°C). Nach Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 10 mM wurden die Untereinheiten durch Ultrazentrifugation konzentriert (45 Ti-Rotor, 120000 x g, 17 Std., 4°C) und in Puffer A mit 10% Glycerin aufgenommen.

3. 1. 3. Isolierung von Ribosomen des Cytoplasmas

Zur Präparation von 80S-Ribosomen aus Spinat wurde der Überstand des Blattfiltrats bei 26000 x g 30 Min. zentrifugiert, um Mitochondrien, Proplastide und Chloroplastenfragmente zu entfernen, und bei 120000 x g 3 Std. ultrazentrifugiert (45 Ti-Rotor, 4°C). Das Gemisch aus 80S-Ribosomen und 70S-Ribosomen aus fragmentierten Chloroplasten wurde durch Zonalzentrifugation in einem Gradienten mit 10-30% Rohrzucker in Puffer A getrennt (Beckman Typ 15-Rotor, 17000 UpM, 19 Std., 4°C). Die Fraktionen wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert (45 Ti-Rotor, 120000 x g, 17 Std., 4°C) und in Puffer A mit 10% Glycerin aufgenommen.

3. 1. 4. Isolierung von Ribosomen und der S150-Fraktion aus *E. coli*

Zur Isolierung von Ribosomen aus *E. coli* wurden 200 g Zellen (MRE 600) mit 300 g Al_2O_3 mit einem mechanisch angetriebenen Mörser gemahlen (30 Min., 4°C). Nach Zugabe von 400 ml Puffer A

(siehe 3.3.1.) mit 200 μg DNAase und weiterem Mahlen (15 Min.) wurde die Suspension zweimal zentrifugiert, um Al_2O_3 und Zellmembranen zu entfernen (5000 x g, 10 Min.; 26000 x g, 30 Min.). Die Ribosomen wurden durch Ultrazentrifugation (160000 x g, 4 Std., 4°C) isoliert und in Puffer A mit 10% Glycerin gelöst. 200 g Zellen ergaben 3 g Ribosomen.

Die oberen zwei Drittel des Überstandes nach der Ultrazentrifugation wurden gegen 10 mM Tris-HCl, 100 mM NH_4Cl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10% Glycerin dialysiert.

3. 1. 5. Trennung von Untereinheiten

Die Trennung der ribosomalen Untereinheiten erfolgte wie in 3.1.2. beschrieben. Dissoziationspuffer war jedoch 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM KCl, 0,3 mM $MgCl_2$.

3. 2. Einfache Charakterisierung von Chloroplasten und Chloroplastenribosomen

3. 2. 1. Chlorophyllbestimmung

Chlorophyll wurde nach Extraktion aus Chloroplastensuspensionen mit 80% Aceton photometrisch bei 652 nm bestimmt. 1 A_{652} = 27 ng Chlorophyll (Walker 1980).

3. 2. 2. Bakterielle Kontamination in Chloroplastenpräparationen

Die bakterielle Kontamination in Chloroplastenpräparationen wurde durch Kolonienzählung von Ausstrichen verdünnter Suspensionen auf Bacto-Trypton-Hefeextrakt-Agarplatten bestimmt. Zusammensetzung (mod. nach Tissières et al. 1969): 1,5% Bactoagar (Difco), 1% Bactotrypton (Difco), 0,5% Hefeextrakt (Difco), 0,5% NaCl, 0,4% Glucose. Inkubation der Ausstriche 24 Std. bei 37°C.

3. 2. 3. Photometrische Abschätzung von RNS und Protein in Ribosomenpräparationen

Zur Bestimmung der Konzentration von Ribosomen wurden die Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm gemessen. Für Ribosomenpräparationen aus E. coli gilt:

$$C_{Rib}\ (mg/ml) = A_{260} \times 0{,}06$$
$$A_{280}/A_{260} = 0{,}5$$

Bei Vorhandensein von größeren Mengen nichtribosomaler Proteine steigt der Quotient A_{280}/A_{260}. Außerdem erhält man zu hohe Werte für die Ribosomenkonzentration C_{Rib}, da auch Proteine bei 260 nm absorbieren. Bei Chloroplastenpräparationen wurde der gemessene A_{260}-Wert zur Bestimmung der Konzentration korrigiert, da einige Präparationen mit großen Mengen Carboxylase und anderen sauren Proteinen kontaminiert waren. Die Korrektur läßt sich einfach vektoriell bestimmen, wenn man voraussetzt, daß bei Ribosomen das Verhältnis $A_{280}/A_{260} = 0{,}5$, bei Proteinen das Verhältnis $A_{280}/A_{260} = 1{,}5$ ist.

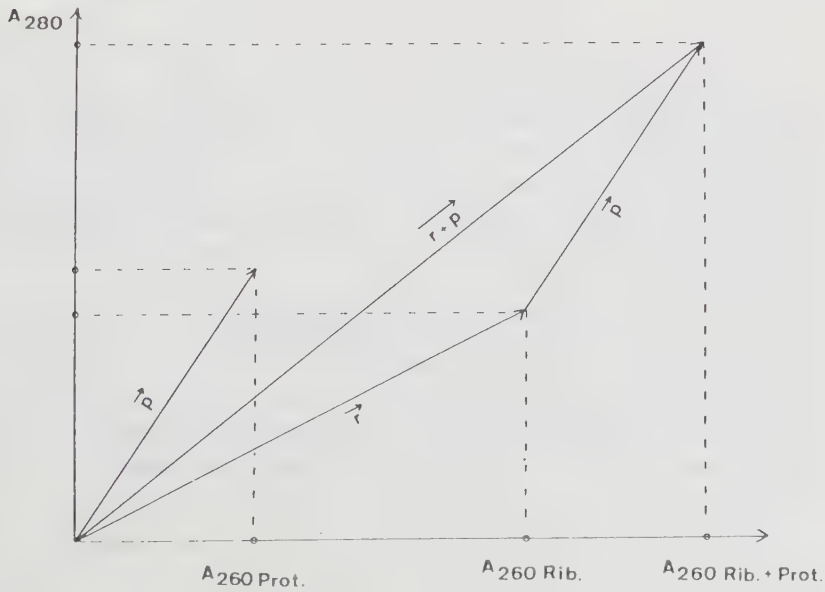


Bild 3: Vektordiagramm zur Bestimmung der Kontamination von Ribosomenpräparationen mit nichtribosomalen Proteinen. $\overrightarrow{r + p}$: Ribosomen und nichtribosomale Proteine (Meßwert), $\vec{r}$: ribosomale Komponente, $\vec{p}$: Komponente, die durch nichtribosomale Proteine hervorgerufen wird.

Aus dem obigen Diagramm können die Komponenten berechnet werden:

$$A_{260\ Rib} = A_{260}(1{,}5 - A_{280}/A_{260})$$
$$A_{260\ Prot} = A_{260}(A_{280}/A_{260} - 0{,}5)$$

Für die Konzentrationen gilt dann:

$$C_{Rib}(mg/ml) = A_{260}(1{,}5 - A_{280}/A_{260})\ 0{,}06$$
$$C_{Prot}(mg/ml) = A_{260}(A_{280}/A_{260} - 0{,}5)\ 0{,}67$$

Wie aus den beiden Formeln zu ersehen ist, enthalten Präparationen mit $A_{280}/A_{260} = 0{,}6$ bereits mehr nichtribosomale Proteine als Ribosomen (mg) und damit etwa dreimal so viel nichtribosomale wie ribosomale Proteine.

3. 2. 4. Quantitative Proteinbestimmung

Hierzu wurde die Methode nach Lowry et al. (1951) verwendet. Der Mechanismus dieser empfindlichen Proteinbestimmungsmethode ist bis heute nicht völlig aufgeklärt. Es wird angenommen, daß Kupferkomplexe wie bei der Biuretreaktion entstehen, die die Phosphormolybdän-Wolframsäure (Folinreagenz) reduzieren. Für die Intensität der Blaufärbung sind im Wesentlichen aromatische Aminosäuren verantwortlich.

Ausführung: Proteinproben (max. 0,1 ml) wurden zu je 1 ml einer frischen Lösung aus 48 ml 2% Na_2CO_3/0,1 M NaOH, 1 ml 0,5% $CuSO_4$, 1 ml 1% NaK-Tartrat gegeben. Nach 10 Min. wurde 50 μl Folinreagenz hinzugegeben. Nach 30 Min. wurde die Extinktion bei 750 nm im Zeiss-Photometer bestimmt. Die Proteinmenge wurde aus einer Eichkurve mit 10, 20, 40, 60, 80μg Rinderalbumin (BSA) bestimmt.

3. 3. Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese

Die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese ist ein Funktionstest für Ribosomen, bei der eine Wechselwirkung zwischen Ribosom, Poly(U), Phenylalanyl-tRNS und den drei Elongationsfaktoren EF-Tu, EF-Ts und EF-G stattfindet. Die Initiation und Termination wird im Gegensatz zur Synthese mit natürlicher mRNS umgangen (kein Ablesen eines Start- oder Stopkodons).

Dieser Test wurde in je 100 µl mit 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 18 mM Mg-Acetat$_2$, 100 mM NH_4Cl, 1 mM Dithiotreitol, 1,6 mM ATP, 0,3 mM GTP, 8 mM Phosphoenolpyruvat, 30 mM pro Aminosäure, 5 µg Pyrovatkinase, 250 µg tRNS (E. coli), 0,1 µCi (≙ 2 µM) ^{14}C-Phenylalanin (NEN), 2 µg Poly(U) (Boehringer), 30 pM Ribosomen oder Untereinheiten (30 µg 30S, 60 µg 50S, 90 µg 70S) und 200 µg S100 (E. coli). Die Mixtur wurde 30 Min. bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 6% Trichloressigsäure/0,1% Casaminosäuren wurde auf 90°C erhitzt (15 Min.), die Proben dann auf Eis gestellt (5 Min.) und die präzipitierte Radioaktivität (Polyphenylalanin) auf Milliporefiltern nach Trocknen gezählt. Szintillationsflüssigkeit war 0,5% 2,5-Diphenyloxazol in Toluol.

3. 4. Extraktion ribosomaler Proteine

Ribosomale Proteine wurden mit 67% Essigsäure (Hardy et al. 1969) oder mit LiCl/Harnstoff (Spitnik-Elson 1965) extrahiert. Extrahierte Proteine von Ribosomen und Untereinheiten wurden nach ihrer Herkunft benannt (z.B. TP70, TP50, TP30).

3. 4. 1. Essigsäureextraktion

Zu den Ribosomen wurden 2 vol einer Lösung von 0,05 M Mg-Acetat in Essigsäure tropfenweise unter Rühren gegeben (4°C). Nach 60 Min. wurde die RNS abzentrifugiert (15000 x g, 15 Min.).

3. 4. 2. LiCl/Harnstoffextraktion

Zu den Ribosomen (10 mg/ml) wurde 1 vol einer Lösung von 4 M LiCl, 8 M Harnstoff tropfenweise unter Rühren gegeben (4°C). Nach 17 Std. wurde die RNS bei 15000 x g 15 Min. abzentrifugiert.

3. 4. 3. Methoden zur Konzentrierung ribosomaler Proteine

Für Elektrophoresen wurden extrahierte Proteine gegen 8 M Harnstoff, 7 mM Mercaptoäthanol dialysiert. Die Proben wurden, wenn nötig, durch trockene Dialyse mit Sephadex G 100 konzentriert. Wurden hochkonzentrierte Proben benötigt (Celluloseacetatgele), wurden die Proben gegen 5% Essigsäure dialysiert und lyophilisiert oder mit 5 vol Aceton über Nacht bei -20°C gefällt (Barritault 1976).

3. 4. 4. Extraktion von Cpl L12 und anderen Proteinen (Methode nach Hamel et al. 1972)

Mit der Methode nach Hamel et al. (1972) können Ribosomen in eine Proteinfraktion (hauptsächlich ribosomales "A"-Protein ≙ E. coli-L12) und ein Corepartikel getrennt werden. Bei Chloroplastenribosomen (70S) entstand nach der Evaporation von Äthanol aus der Proteinfraktion durch Präzipitation eine weitere Fraktion, die hauptsächlich einige basische ribosomale Proteine enthielt.

Ausführung: Ribosomen waren in einer Lösung von 1 M NH_4Cl, 0,02 M $MgCl_2$, 0,01 M Imidazol-HCl pH 7,4, 1 mM Mercaptoäthanol (Konzentration 4 mg/ml). Unter Rühren wurde ein halbes Volumen Äthanol zugegeben. Nach 10 Min. wurde nochmals dieselbe Menge Äthanol zugegeben. Die präzipitierten Corepartikel der Ribosomen (Fraktion 3) wurden durch Zentrifugation bei 30000 x g 10 Min. abgetrennt (alles bei 4°C). Nach Rotationsevaporation von Äthanol bei 20°C entstand ein Präzipitat, das abzentrifugiert wurde (Fraktion 2).

3. 4. 4. 1. Fraktion 1 (Cpl L12)

Das lösliche Material (Fraktion 1) wurde durch Ultrafiltration (Membran YM5, Amicon) konzentriert und gegen Säulenpuffer dialysiert (siehe 3.5.1.). Eine spätere Präparation wurde mit Aceton gefällt und in Säulenpuffer aufgenommen.

3. 4. 4. 2. Fraktion 2 (basische Proteine)

Das Präzipitat, das nach Evaporation von Äthanol entstanden war, wurde in 60% Essigsäure aufgenommen und gegen Säulenpuffer (3.5.2.) dialysiert.

3. 4. 4. 3. Fraktion 3 (ribosomale Corepartikel)

Präzipitierte Corepartikel aus mehreren Präparationen (4,5 g) wurden in 200 ml Puffer A (siehe 3.1.) suspendiert. Das Protein wurde extrahiert, mit Aceton gefällt (siehe 3.4.1. und 3.4.3.) und in 20 ml Säulenpuffer (3.6.) aufgenommen.

3. 5. Ionenaustauschchromatographie

Die Trennung von Molekülen durch Ionenaustauschchromatographie (Pharmacia 1980) wird durch reversible Absorption erreicht. Im ersten Schritt wird die Probe aufgetragen und vom Säulenmaterial absorbiert. Nicht bindende Substanzen werden mit Puffer ausgewaschen. Im zweiten Schritt wird das Material von der Säule eluiert. Trennung wird durch die verschieden starke Affinität aufgrund unterschiedlicher Ladungen verschiedener Substanzen zum Ionenaustauscher erreicht. Die Affinität zum Säulenmaterial wird durch Variation der Bedingungen wie pH und Ionenstärke kontrolliert.

Zur Aufreinigung des sauren Proteins Cpl L12 aus Fraktion 1 wurde ein Anionenaustauscher aus DEAE-Cellulose verwendet. Zur Trennung von basischen Proteinen wurde ein Kationenaustauscher

aus Carboxymethylcellulose benutzt.

3. 5. 1. Anionenaustauschchromatographie, Aufreinigung von Cpl L12 aus Fraktion 1

Zur Isolierung von Protein Cpl L12 wurde Fraktion 1 (löslicher Extrakt aus 0,5 g Ribosomen) auf eine Säule (1 x 10 cm) aus DEAE-Cellulose (Whatman 52) aufgetragen. Säulenpuffer war 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 6 M Harnstoff. Nach Waschen mit Säulenpuffer wurde mit einem linearen Gradienten (200 ml 0-0,2 M NaCl im Säulenpuffer) eluiert. Fließgeschwindigkeit war 0,25 ml/Min. Gesammelt wurden Fraktionen à 2 ml. Die UV-Absorption des Eluats bei 280 nm wurde mit einem Monitor (Isco UA5) aufgezeichnet.

Reinheit und Identität der Fraktionen wurden mit ein- und zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt. Nach Messung der Leitfähigkeit wurden die ausgewählten Fraktionen vereinigt, extensiv gegen 0,1% NH_4OH dialysiert und lyophilisiert.

3. 5. 2. Kationenaustauschchromatographie zur Isolierung des basischen Proteins b1 aus Fraktion 2

Zur Isolierung von Protein b1 wurde Fraktion 2 (Präzipitat des Extrakts von ca. 0,5 g Ribosomen) auf eine Säule (1 x 10 cm) mit Carboxymethylcellulose aufgetragen. Säulenpuffer war 10 mM Na-Phosphat pH 6,5, 6 M Harnstoff. Nach Waschen mit Säulenpuffer wurde mit einem linearen Gradienten (200 ml 0-0,6 M KCl in Säulenpuffer) eluiert. Fließgeschwindigkeit war 0,25 ml/Min. Gesammelt wurden Fraktionen à 2 ml. Die UV-Absorption der Fraktion wurde bei 230 nm mit einem Zeiss-Photometer bestimmt. Aliquots der Fraktion wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Fraktionen, die Protein b1 enthielten, wurden gegen 10% Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

3. 5. 3. HPLC, weitere Auftrennung von Protein b1

Zur Verwendung kam ein HPLC-System (High Performance Chromatograph 850, Dupont) mit einer RP-P-Säule (240 x 4 mm, Korngröße 10 μm, Synchron USA) mit einem hochempfindlichen UV-Detektor (Dupont 852). Das lyophilisierte Protein wurde in 0,1% TCA aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten, der aus 0,1% TFA und 60% Propanol gebildet wurde (Druck 84-290 bar). Die Fließgeschwindigkeit war 1 ml/Min., gesammelt wurden Fraktionen à 0,5 ml. Die Fraktionen wurden durch Trocknen konzentriert und mit einem Harnstoff/Polyacrylamidgel auf Homogenität untersucht. Aminosäurezusammensetzungen und N-terminale Aminosäuren von Protein b1 und b2 wurden aus der homogenen Gipfelfraktion bestimmt. Die Identität der isolierten Proteine wurde aus den angrenzenden, etwas unreinen Fraktionen durch zweidimensionale Gelelektrophorese bestimmt.

3. 6. Gelfiltration

Sollen Proteine oder Peptide nach Größe getrennt werden, so bieten sich Gelfiltrationen mit verschiedenen Typen von Sephadexgelen (Pharmacia Fine Chemicals) an. Sephadex besteht aus mit Epichlorhydrin quervernetztem Dextran. Der Quervernetzungsgrad bestimmt den Molekulargewichtsbereich, in dem das Gel zur Fraktionierung von Molekülen verwendet werden kann. Während der Filtration durch das Säulengel kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen den filtrierten Substanzen und den Poren des Gels, in denen die Substanzen zurückgehalten werden. Große Moleküle werden weniger als kleine Moleküle zurückgehalten, da die Poren für die kleineren Moleküle leichter zugänglich sind (Pharmacia 1980). Es wurde mit Sephadex G 100 Superfine (Trennung von Proteinen), G 75 (Trennung von größeren Peptiden), G 25 (Gruppentrennung von hoch- und niedermolekularen Substanzen) gearbeitet.

3. 6. 1. Trennung von Proteinen aus Fraktion 3

Auftrennung von Proteinen aus Fraktion 3 erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex G 100 Superfine (Säulengröße 40 x 1000 mm), Fließmittel war 6 M Harnstoff, 5% Essigsäure. 1,5 g Protein wurde in 20 ml Fließmittel aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit war 3,6 ml/Std., gesammelt wurden Fraktionen à 5 ml. Die Absorption des Eluats bei 280 nm wurde mit einem Monitor (Isco UA 5) aufgezeichnet. Jede dritte Fraktion wurde durch eindimensionale Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen und Harnstoffpolyacrylamidgelen untersucht. Jede fünfte Fraktion wurde mit zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

3. 7. Polyacrylamidgelelektrophoresen

3. 7. 1. Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophoresen

3. 7. 1. 1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen nach Laemmli

Verwendet wurde ein etwas modifiziertes diskontinuierliches System nach Laemmli (1970). In SDS-Polyacrylamidgelen werden Proteine aufgrund ihrer Molekulargewichtsunterschiede getrennt. Bei Verwendung von geeigneten Standardproteinen kann die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wie die Sephadexgelfiltration zur Bestimmung des Molekulargewichts verwendet werden (Weber und Osborn 1969). Auch RNS oder die Einzelkomponenten von RNS-Proteinkomplexen können mit diesem System getrennt werden.

Trenngel war, wenn nicht anders erwähnt, ein Gradientengel (160 x 100 x 1 mm) mit 12-20% Acrylamid (Acrylamid:Methylenbisacrylamid=33:1) in 190 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$, 0,1% SDS. Das Gel wurde mit 1/1000 Temed und 1/2000 Ammoniumpersulfat polymerisiert. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Gel mit 0,1% SDS übersprüht.

Probengel war ein 10 mm hohes Gel mit 5% Acrylamid (Acryl-

amid:Methylenbisacrylamid=33:1) in 63 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$, 0,1% SDS, 1/1000 Temed und 1/1000 Ammoniumpersulfat.

Elektrodenpuffer war 50 mM Tris, 380 mM Glycin, 2 mM $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$, 0,1% SDS.

Die Proben wurden in 5-20 μl Probenpuffer aufgenommen (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$, 1% SDS, 5% Mercaptoäthanol, 10% Glycerin, 0,05% Bromophenolblau).Vor der Elektrophorese wurden Proteine oder Ribosomen durch Erhitzen (2 Min., 95°C) vollständig denaturiert. Elektrophorese 17 Std., 35 V oder 5 Std. 90 V gegen die Anode.

3. 7. 1. 2. Harnstoffacrylamidgel nach Kaltschmidt und Wittmann

Dieses Gel eignet sich als Alternative zum SDS-Gel. Proteine werden hauptsächlich, aber nicht nur, nach Molekulargewicht aufgetrennt. Vor allem die Proteine mit kleinem Molekulargewicht (10000) werden besser als im SDS-Gel getrennt.

Trenngel (Kaltschmidt und Wittmann 1970): 18% Acrylamid, 0,5% Methylenbisacrylamid, 6 M Harnstoff, 1 M Essigsäure, 0,048 M KOH, 1/160 Temed, 1/330 Ammoniumpersulfat.

Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin, 0,025 M Essigsäure.

Die Proben wurden in 8 M Harnstoff, 6 M Mercaptoäthanol aufgetragen. Elektrophorese 17 Std, 110 V, gegen die Kathode.

3. 7. 2. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophoresen

Zur zweidimensionalen Auftrennung von ribosomalen Proteinen wurden drei Elektrophoresesysteme verwendet (Mets und Bogorad 1974, Li und Subramanian 1976, Geyl et al. 1981). In allen Systemen werden die ribosomalen Proteine zuerst in einem niederprozentigen Acrylamidgel mit geringem Quervernetzungsgrad hauptsächlich nach Ladung getrennt. In der zweiten Dimension werden die Proteine hauptsächlich nach Molekulargewicht ge-

trennt. Hierzu wird in der zweiten Dimension ein SDS-Gel oder ein hochprozentiges Acrylamidgel mit relativ hohem Quervernetzungsgrad benutzt. Das Gelsystem von Mets und Bogorad eignet sich gut zur Darstellung von hochmolekularen Proteinen. Der pH-Wert des Gels für die erste Dimension eignet sich zur vollständigen Darstellung der ribosomalen Proteine aus fast allen Organismen.

Zur selektiven Darstellung von sauren Proteinen wurde die erste Dimension dieses Systems modifiziert (Li und Subramanian 1974).

Das System nach Geyl et al. (1981) kombiniert die erste Dimension von Mets und Bogorad mit der zweiten Dimension des Gelsystems nach Kaltschmidt und Wittmann. Es ist einfach auszuführen und ergibt eine hervorragende Trennung der ribosomalen Proteine. Diese Kombination wurde bereits von Madjar et al. (1979) verwendet. Die verwendeten Puffer und Gelzusammensetzungen sind in den Originalarbeiten ausführlich beschrieben und sind im folgenden angegeben.

3. 7. 2. 1. Elektrophorese nach Mets und Bogorad

Erste Dimension: Röhrchengele 100 x 5 mm, 4% Acrylamid, 0,1% Methylenbisacrylamid, 0,057 M Bistris-Essigsäure pH 4,5, 8 M Harnstoff, 1/1000 Temed, 1/200 Ammoniumpersulfat. Vor der Polymerisation wurden die Gele mit 6 M Harnstoff im oberen Elektrodenpuffer überschichtet. Oberer Elektrodenpuffer: 0,01 M Bistris-Essigsäure pH 4,0. Unterer Elektrodenpuffer: 0,02 M Kaliumacetat-Essigsäure pH 5,0. Probenpuffer: 0,01 M Bistris-Essigsäure pH 4,0, 8 M Harnstoff, 7 mM Mercaptoäthanol, 0,001% basisches Fuchsin. Elektrophorese 4 Std., 3 mA/Gel, gegen die Kathode.

Zweite Dimension: Trenngel 100 x 100 x 3 mm oder 100 x 100 x 1,5 mm, 10% Acrylamid, 0,5% Methylenbisacrylamid, 0,14 M Bistris-HCl pH 6,75, 1/1000 Temed, 1/200 Ammoniumpersulfat. Die Gele wurden vor der Polymerisation mit 0,1% SDS übersprüht. Zwischengel: 10 mm Höhe, 4% Acrylamid, 0,1% Methylenbisacrylamid, 0,14 M Bistris-HCl pH 6,75, 7 M Harnstoff, 0,2% SDS, 1/600 Temed, 1/125 Ammoniumpersulfat. Oberer Elektrodenpuffer:

0,7 M Bistris-MES pH 6,5, 0,2% SDS, 0,01% Thioglycolsäure. Unterer Elektrodenpuffer: 0,028 M Bistris-HCl pH 6,75. Elektrophorese 4 Std., 25 mA/3 mm Gel, gegen die Anode.

3. 7. 2. 2. Modifikation nach Li und Subramanian

Erste Dimension: Röhrchengele 4% Acrylamid, 0,1% Methylenbisacrylamid, 0,057 M Bistris-Essigsäure pH 5,2, 8 M Harnstoff, 1/1000 Temed und 1/200 Ammoniumpersulfat. Vor der Polymerisation waren die Gele mit 6 M Harnstoff im oberen Elektrodenpuffer überschichtet. Oberer Elektrodenpuffer: 0,029 M Bistris-Essigsäure pH 6. Probenpuffer: 0,02 M Bistris-MES pH 7, 8 M Harnstoff, 0,1% Bromophenolblau. Elektrophorese 4 Std., 3 mA/Gel,gegen die Anode.

Zweite Dimension erfolgte nach Mets und Bogorad.

3. 7. 2. 3. Modifikation nach Geyl et al.

Die Röhrchengele der ersten Dimension wurden nach Mets und Bogorad angefertigt. Sie wurden direkt mit dem Trenngel nach Kaltschmidt und Wittmann (siehe 3.7.1.2.) verbunden. Elektrophorese 17 Std., 80 V, 4°C, gegen die Kathode.

3. 7. 3. Färben von Acrylamidgelen

3. 7. 3. 1. Coumassieblaufärbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit 0,1% Coumassieblau in 50% Methanol, 7,5% Essigsäure, Wasser eine Stunde gefärbt, 5-10 Min. in 50% Methanol, 7,5% Essigsäure, Wasser und bis zur völligen Entfärbung des Hintergrundes mit 20% Methanol, 7,5% Essigsäure, Wasser entfärbt. Hierbei werden Proteine rotviolett bis tiefblau angefärbt.

3. 7. 3. 2. Toluidinblaufärbung

Zur Darstellung von RNS-Molekülen wurden die Gele nach Waschen (3 Std.) mit 0,1% Toluidinblau gefärbt und der Hintergrund entfärbt. Alle Schritte waren in 20% Methanol, 7,5% Essigsäure, Wasser.

Die Gele wurden zur Dokumentation unter Verwendung eines Orange-Filters photographiert. Mit Coumassie- oder Toluidinblau lassen sich 0,2-1 μg Protein oder RNS pro Bande gut darstellen.

3. 7. 3. 3. Silberfärbung

Einige Gele wurden mit der weitaus empfindlicheren Silberfärbung nachgefärbt (Merril et al. 1981, Switzer et al. 1979). Hierzu wurde ein Färbesystem der Firma Biorad verwendet.

3. 8. Immunelektrophorese auf Celluloseacetatgelen

Auf Celluloseacetatgelen werden Proteine nach ihrer Ladung aufgetrennt. Wie bei der Stärkegelelektrophorese tritt bei der Verwendung von Celluloseacetatgelen kein "molecular sieving effect" auf, d.h. auch bei großen Proteinen wird die Mobilität fast ausschließlich durch die Ladung derselben bestimmt. Ein wesentlicher Vorteil der Celluloseacetatgelelektrophorese ist ihre schnelle Durchführbarkeit. Auf Celluloseacetatgelen können Immunpräzipitate direkt durch Färbung mit Coumassieblau nachgewiesen werden. Je nach Titer des verwendeten Antikörpers werden die Banden des Antigens durch den Antigen-Antikörperkomplex erheblich verstärkt (Stöffler 1967, Zubke et al. 1977).

3. 8. 1. Elektrophorese und Coumassieblaufärbung

Celluloseacetatstreifen wurden in 30% Methanol aufbewahrt. Vor der Elektrophorese wurden die Streifen im Elektrodenpuffer (0,1 M Tris, 0,1 M Bicine, 50 mM Mercaptoäthanol, 8 M Harnstoff)

zweimal gewaschen und zwischen Papiertüchern kurz getrocknet und in die Elektrophoresenapparatur eingelegt. Lyophilisierte Proteine wurden bei einer Konzentration von 20-100 µg/ml im Probenpuffer gelöst (0,07 M Bistris, 0,07 M MES, 8 M Harnstoff, 0,05 M Mercaptoäthanol) und mit einem Applikator in der gewünschten Menge 0,25 µl-weise aufgetragen. Die Elektrophorese ribosomaler Proteine erfolgte bei 350 V, 3 mA, 80 Min. gegen die Kathode.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine zur Färbung zweimal 15 Min. in 12,5% Trichloressigsäure fixiert, dann mit 1% Coumassieblau in 50% Methanol, 7,5% Essigsäure, Wasser gefärbt (3 Std.) und nach zweimaligem Waschen in 7,5% Essigsäure in 50% Methanol, 7,5% Essigsäure, Wasser entfärbt.

Durch Behandlung mit Phtalsäuredimethylester können Celluloseacetatgele transparent gemacht werden. Hierzu wurde das Gel in Methanol ein bis zwei Minuten entwässert und mit 14% Essigsäure, 1% Phtalsäuredimethylesther in Methanol behandelt und auf einer Glasplatte bei 60°C getrocknet.

3. 8. 2. Immunpräzipitation

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst zweimal eine Minute mit PBS (10 mM K-Phosphat pH 7,4, 0,9% NaCl) gewaschen. Hierbei wird Harnstoff entfernt und die Proteine relativ unlöslich. Anschließend wurde das Gel über Nacht im gewünschten Serum inkubiert. Nach Waschen in PBS wurden die präzipitierten Immunkomplexe mit Coumassieblau angefärbt.

3. 9. Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid- und Celluloseacetatgelen auf Nitrocellulosepapier

3. 9. 1. Transfer

Nach der Elektrophorese wurden Polyacrylamidgele zunächst in Transferpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol, 0,1%

SDS) äquilibriert. Der elektrophoretische Transfer von Proteinen erfolgte auf Membranfilter aus Nitrocellulose BA 83 (Schleicher und Schüll) mit 0,2 µm Porengröße in einer speziellen Elektrophoresekammer (Hofer TE 42) bei 6V/cm, 4 Std. oder 2,5 V/cm, 17 Std. (mod. nach Towbin et al. 1979). Der Transfer von Proteinen, die auf Celluloseacetatgelen getrennt waren, wurde auf die gleiche Weise bei 6 V/cm, 60 Min. durchgeführt.

3. 9. 2. Färben auf Proteinen

3. 9. 2. 1. Coumassieblaufärbung

Proteine auf Nitrocellulosepapier wurden mit Coumassieblau (0,1% Coumassieblau in 50% Methanol, 7% Essigsäure, Wasser) angefärbt. Der Hintergrund wurde mit 90% Methanol, 7% Essigsäure, Wasser entfärbt (Towbin et al. 1979).

3. 9. 2. 2. Reversible Toluidinblaufärbung

Hierzu wurden die Nitrocellulosereplikate mit einem sauren Protein abgesättigt (100 µg/ml Heparin in 10 mM K-Acetat-Essigsäure pH 5, 3 Min.). Nach Waschen (3 x 3 Min.) wurden die Replikate mit Toluidinblau (200 µg/ml im gleichen Puffer, 3 Min.) angefärbt. Ribosomale Proteine erscheinen rotviolett auf blauem Hintergrund. Nach Markieren der Positionen von ribosomalen Proteinen wurden die Replikate zur Antikörperinkubation wieder entfärbt (50% Methanol, 2% Essigsäure, Wasser, 1 Std., Towbin et al. 1982).

3. 9. 2. 3. Silberfärbung

Auch auf Nitrocellulosepapier können Proteine mit der hochempfindlichen Silberfärbung dargestellt werden. Proteine werden hell auf dunklem Hintergrund sichtbar. Silberfärbung beeinflußt die Antigen-Antikörper-Reaktion nicht (Yuen et al. 1982).

3. 10. Immunabsorption auf Nitrocellulosepapier und Antikörpernachweis mit konjugierten Antikörpern

Gefärbte und ungefärbte Replikate wurden mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) in Standardpuffer 1 (K-Phosphat pH 7,4, 0,9% NaCl, 0,5% Triton X 100, 0,2% SDS, 30 Min.) abgesättigt und mit dem gewünschten Serum in Standardpuffer 1/1% BSA inkubiert (Serumverdünnung 1:10 bis 1:100). Nach Waschen in Standardpuffer 1 wurden die Replikate mit dem zweiten Antikörper inkubiert (Fluoresceinkonjugate 30 Min. in Standardpuffer 1, Peroxydasekonjugate 3 Std. in Standardpuffer 2; dieser enthält anstelle von SDS N-Lauroylsarcosin als ionisches Detergenz).

Fluoresceinkonjugierte Antikörper wurden unter langwelligem UV-Licht nachgewiesen, peroxydasekonjugierte Antikörper mit einem rötlichen Farbstoff, der bei der Oxydation von 3-Amino 9-Äthylcarbazol (Sigma) entsteht. Hierzu wurden die Nitrocellulosereplikate in 10 mM K-Acetat-Essigsäure pH 5,0 mit 0,04% Farbstoff und 0,003% H_2O_2 inkubiert. Je nach ihrer Intensität wurde die Farbreaktion nach ein bis dreißig Minuten durch Waschen mit Wasser gestoppt.

3. 11. Konjugierte Antikörper

3. 11. 1. Fluoresceinkonjugierte Antikörper

Zur Konjugation wurde IgG 2 mg/ml in 0,2 M Na-Borat-Borsäure pH 8,8 und 1 mM Fluoresceinisothiocyanat (Merck) 1 Std. bei 20°C inkubiert. Bei pH 8,8 wird Fluoresceinisothiocyanat nur an den N-Terminus und an Aminogruppen der Seitenketten von Lysin im Protein angelagert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin gestoppt. Das mit Fluorescein konjugierte IgG wurde durch Gelfiltration mit einer Sephadex G 25-Säule (Pharmacia) isoliert. Fließmittel war K-Phosphat pH 7,4, 0,9% NaCl.

Die Anzahl der gekoppelten Fluoresceinmoleküle wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 495 nm und 280 nm bestimmt.

$$C_F = A_{495}/55000$$
$$C_{Prot} = A_{280}/20000$$

(C_F und C_{Prot} sind die Konzentrationen von Fluorescein und Protein in Mol).

Der Quotient C_F/C_{Prot} gibt die Anzahl der gekoppelten Fluoresceinmoleküle pro IgG-Molekül an. Die konjugierten Antikörper wurden auf Ouchterlonyplatten (siehe 3.12.) und mit Teststreifen aus Nitrocellulosepapier auf die Reaktivität und Spezifität gegen das entsprechende Antigen getestet.

Fluoresceinkonjugierte Antikörper wurden zum Nachweis von IgG auf Nitrocellulose in einer Verdünnung von 1:1 bis 1:10 verwendet. C_F/C_{Prot} der präparierten Antikörper war 2-5.

3. 11. 2. Peroxydasekonjugierte Antikörper

Verwendet wurden konjugierte Antikörper der Firma Sigma (IgG-Fraktion aus dem Antiserum) in einer Verdünnung von 1:200. Konjugation von Peroxydase und IgG erfolgte mit der Perjodatmethode (Nakane et al. 1974).

3. 12. Radiale Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

Bei dieser Methode läßt man Antiseren in Agarplatten gegen entsprechende Antigene diffundieren. Bei ihrem Aufeinandertreffen kommt es zu einer opaken Präzipitationslinie. Die Lage dieser Präzipitationslinie ist abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner. Läßt man Antigene nebeneinander gegen ein polyvalentes Antiserum diffundieren, so lassen sich aus dem Präzipitationsmuster Rückschlüsse über die Art der Antigene ziehen. Man kann unterscheiden zwischen dem Muster der Antigenidentität (Fusion der beiden Präzipitationslinien), dem Muster der Teilidentität (Spornbildung, Kreuzreaktion) und dem Muster der Nichtidentität (Durchkreuzen der beiden Präzipitationslinien am Berührungspunkt).

Zur Herstellung der Agarplatten wurden 1,5% Agarose A (Serva)

in 0,02 M Barbital-Acetat pH 8,4, 0,77 M Li-Chlorid im kochenden Wasserbad gelöst und je 30 ml in eine 10 x 10 cm große Petrischale gegossen. Löcher für die Proben wurden mit einer Schablone und Korkbohrern wie gewünscht ausgestanzt. Immunpräzipitate wurden nach 72-stündiger Diffusion durch indirekte Beleuchtung sichtbar gemacht (Stöffler und Wittmann 1971).

3. 13. Antiseren gegen Ribosomen und ribosomale Proteine

Verwendet wurden Antiseren und Immunglobuline, die großzügig von Prof. Dr. G. Stöffler zur Verfügung gestellt wurden. Zum Teil waren die Seren durch Absorption und/oder Affinitätschromatographie gereinigt worden, um Antikörper mit möglichst hoher Spezifität gegen einzelne ribosomale Proteine zu erhalten.

Für Absättigungsversuche wurde zu den Seren das entsprechende Antigen (0,3 μg/ μl) gegeben. Nach Inkubation (2 Std. bei 37°C, dann 6 Std. bei 4°C) wurde das Immunpräzipitat abzentrifugiert und der Überstand als Kontrollserum verwendet.

3. 14. Aminosäurezusammensetzungen

Aminosäurezusammensetzungen wurden durch saure Hydrolyse der Peptidbindungen und Nachweis der entstandenen Aminosäuren im Aminosäureanalysator bestimmt. Tryptophan wird durch diese Behandlung zerstört, auch Serin und Threonin gehen zum Teil verloren. Asparagin und Glutamin werden als Säuren nachgewiesen, da aus den Amidgruppen quantitativ Carboxylgruppen und Ammoniumionen entstehen. Cystein wurde nach Oxidation als Cysteinsäure bestimmt.

3. 14. 1. Totalhydrolysen

2-5 nmol des intakten Proteins wurden in ca. 0,1 ml 5,7 N HCl, 0,02% Mercaptoäthanol 20 Std. bei 110°C unter Vakuum hydrolysiert. Die ge-

trockneten Proben wurden in 50 μl Citratpuffer pH 2,2 (1,96 g Na-Citrat, 1,7 ml HCl, 2 ml Thioglycol, 0,1 ml Phenol pro Liter) aufgenommen und in einem Durrum D 500-Aminosäureanalysator analysiert. Bei Peptiden wurde ebenso, jedoch auch mit geringeren Mengen, verfahren.

3. 14. 2. Totalhydrolysen nach Oxydation mit Perameisensäure

Cystein wurde nach Oxydation als Cysteinsäure bestimmt (Hirs 1967). Hierzu wurde 2 nmol Protein in 0,2 ml 1,5% H_2O_2 in Ameisensäure 2 Std. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml H_2O wurde die Probe lyophilisiert, hydrolysiert und im Aminosäureanalysator untersucht. Cysteinsäure erscheint nach 5 1/2 Min. vor Asp im Durrum D 500-Analysator unter den angewendeten Bedingungen.

3. 14. 3. Bestimmung des Tryptophangehalts durch UV-Spektrometrie

Die Absorption von Proteinen im UV-Bereich zwischen 250 und 310 nm ist vor allem auf die Absorption der drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zurückzuführen (Beaven und Holiday 1952). Bei Wellenlängen, die >280 nm sind, kann die Absorption von Phenylalanin wegen der niedrigen molaren Absorption vernachlässigt werden und aus den Absorptionswerten bei 280 und 294 nm der Gehalt von Tryptophan und Tyrosin in einer Proteinlösung bestimmt werden (Goodwin und Morton 1970). Da Protein Cpl L12 kein Tyrosin enthält (Ergebnis der Hydrolyse), konnte aus dem Absorptionswert bei 280 nm bei bekannter Konzentration des Proteins der Tryptophangehalt ermittelt werden. Die molare Absorption von Tryptophan beträgt in neutraler Lösung $E_{280}^{Trp} = 5559\ M^{-1}cm^{-1}$.

3. 15. Enzymatische Spaltungen zur Bestimmung der Primärstruktur von Cpl L12

Die zur Bestimmung der Primärstruktur notwendigen enzymatischen Spaltungen des Proteins wurden mit TPCK-Trypsin (Merck), Chymotrypsin (Merck), Pepsin (Serva), Staphylococcus aureus-Protease (Miles) und Carboxypeptidase A (Sigma) durchgeführt.

3. 15. 1. Spaltungen am intakten Protein

3. 15. 1. 1. Spaltungen mit TPCK-Trypsin

Spezifische Spaltungen erfolgen nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Die Bindungen mit Prolin werden nicht gespalten.

Tryptische Verdauungen von insgesamt 5,9 mg Protein erfolgen in 0,02 M N-Methylmorpholinacetat pH 8,1 (NMM) bei 37°C, 4 Std. Enzym-Substrat-Verhältnis war 1:50.

3. 15. 1. 2. Spaltungen mit Chymotrypsin

Spaltungen durch Chymotrypsin erfolgen vor allem nach den grossen, hydrophoben Aminosäureresten von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan,Methionin, Leucin, Isoleucin und nach Histidin.

Die Bedingungen für die Spaltung von 1 mg Protein mit Chymotrypsin waren dieselben wie bei der tryptischen Spaltung (siehe 3.15.1.2.).

3. 15. 1. 3. Spaltungen mit Pepsin

Spaltungen mit Pepsin können vor Tryptophan, Tyrosin, Methionin, Alanin, Valin, Threonin und vor und nach Phenylalanin und Leucin und nach Glutaminsäure entstehen.

Spaltung von 1 mg Protein mit Pepsin erfolgte in 5% Ameisensäure bei 37°C, 4 Std. Enzym-Substrat-Verhältnis war 1:50.

3. 15. 1. 4. Spaltungen mit Staphylococcus aureus-Protease

Spaltungen mit Staphylococcus aureus-Protease bei pH 4,0 erfolgen spezifisch nach Glutaminsäure. Nicht gespalten werden die Glutaminsäurebindungen mit Prolin und diejenigen in der Nähe des C-terminalen Endes.

Bei pH 8,1 werden auch die Bindungen nach Glutamin, Asparaginsäure und Asparagin gespalten.

Spaltung von 0,54 mg Protein mit Staphylococcus aureus-Protease erfolgte in 0,1 M Ammoniumacetat pH 4,0 bei 37°C, 4 Std. Enzym-Substrat-Verhältnis war 1:50.

3. 15. 1. 5. Carboxypeptidase A

Carboxypeptidase A ist eine Exopeptidase, die sukzessiv bevorzugt hydrophobe Aminosäuren am C-terminalen Ende von Proteinen abspaltet (Tsugita und Van den Broek 1977). Es wurden 20 Einheiten Carboxypeptidase A mit 135 µg Protein in 0,2 M NMM bei 37°C inkubiert. Nach 0, 10, 20 und 40 Min. wurde die Probe eingefroren, lyophilisiert und im Aminosäureanalysator untersucht.

3. 15. 2. Nachspaltungen der großen tryptischen Peptide

Die beiden großen tryptischen Peptide T1, T3 wurden mit Thermolysin (T1, T3), mit Trypsin (T1), mit Chymotrypsin (T3) und mit Staphylococcus aureus-Protease (T3) nachgespalten.

3. 15. 2. 1. Nachspaltung mit Thermolysin

Spaltung mit Thermolysin kann vor Leucin, Valin, Threonin, Isoleucin und vor und nach Asparagin, Asparaginsäure, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Alanin erfolgen. Spaltung mit Thermolysin war in 0,2 M NMM pH 8,1 bei 50°C, 4 Std.

Enzym-Substrat-Verhältnis war 1:50.

3. 15. 2. 2. Nachspaltung mit Trypsin

Die Nachspaltung des tryptischen Peptids T1 mit Trypsin erfolgte in 0,2 M NMM pH 8,1 bei 37°C, 8 Std. Enzym-Substrat-Verhältnis war 1:10.

3. 15. 2. 3. Nachspaltung mit Chymotrypsin

Die Nachspaltung erfolgte in 0,2 M NMM 4 Std. bei 37°C. Enzym-Substrat-Verhältnis war 1:50.

3. 15. 2. 4. Nachspaltung mit *Staphylococcus aureus*-Protease

Die Nachspaltung erfolgte wie in 3.15.2.3., jedoch bei pH 8,1.

3. 16. Peptidtrennungen auf Dünnschichtplatten

3. 16. 1. Dünnschichtfingerprinttechnik

Peptidgemische, die nach den enzymatischen Spaltungen entstanden waren, wurden auf Cellulosedünnschichtplatten zweidimensional durch Elektrophorese und aufsteigende Chromatographie getrennt. Die Peptide werden aufgrund ihrer Ladung, ihres unterschiedlichen Molekulargewichts und entsprechend dem Gehalt an hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren getrennt. Verwendet wurden Dünnschichtplatten Polygran CEL 300, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,1 mm (Macherey Nagel & Co., Düren).

Die Proben (ca. 20 nmol gespaltenes Protein in 3 µl Wasser) wurden nach Anfeuchten der Platte mit Elektrophoresepuffer (Pyridin : Essigsäure : Aceton : Wasser = 2 : 4 : 15 : 79, pH 4,4) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 400 V (16-18 mA),

2 Std.

Nach Trocknen der Platten erfolgte aufsteigende Chromatographie im PBEW-System (Pyridin:Butanol:Essigsäure:Wasser=40:60:12:48) für 6-8 Std.

3. 16. 2. Nachweis von Peptiden auf Dünnschichtplatten

Peptide auf Dünnschichtplatten wurden mit Fluorescamin (Serva) oder mit Ninhydrin (Merck) sichtbar gemacht. Tryptophan wurde mit Ehrlichreagenz nachgewiesen.

3. 16. 2. 1. Nachweis mit Fluorescamin

Fluorescamin reagiert mit primären Aminogruppen von Proteinen und Peptiden im alkalischen Bereich (pH 9). Die Fluoreszenz verringert sich im Laufe von Stunden. Wegen der verwendeten sehr geringen Konzentration wird ein erheblich geringerer Prozentsatz von N-terminalen Aminosäuren als bei der Ninhydrin-Reaktion zerstört.

Die Cellulosedünnschichtplatten wurden zuerst mit einer Lösung von 5% Pyridin in Aceton angefeuchtet. Die noch feuchten Dünnschichtplatten wurden dann mit 0,005% Fluorescamin in Aceton behandelt. Die Peptide wurden unter langwelligem UV-Licht (360 nm) markiert (Vanderkerckhove und Van Montagu 1974).

3. 16. 2. 2. Nachweis mit Ninhydrin

Mit Ninhydrin bilden Aminogruppen von Aminosäuren und Peptiden einen blauvioletten Farbstoff. Die zu untersuchenden Dünnschichtplatten wurden mit einer Lösung aus 3 g Ninhydrin in 30 ml Collidin, 100 ml Essigsäure und 870 ml Äthanol besprüht. Die Peptidflecken konnten nach einer Reaktionszeit von 60 Min. markiert werden.

3. 16. 2. 3. Tryptophannachweis

Zum Tryptophannachweis wurden Dünnschichtplatten, auf denen die tryptischen oder peptischen Peptide getrennt und markiert waren, mit 1% N-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck) in 10 ml konzentrierter HCl, 90 ml Aceton besprüht. Nach Trocknen der Platte wurden die tryptophanhaltigen Peptide als rotviolette Flekken identifiziert (Spiess und Chambers 1949).

3. 16. 3. Elution der Peptide aus Dünnschichtplatten

Die auf Cellulosedünnschichtplatten getrennten und markierten Peptide wurden abgekratzt und die Peptide in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Eppendorf Gerätebau) zweimal mit 50% Essigsäure extrahiert. Peptide von 3-6 Dünnschichtplatten wurden hierbei vereinigt. Nach Abzentrifugieren der Celluloseteilchen wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Jeweils ein Drittel des Materials wurde zur Aminosäurebestimmung hydrolysiert, jeweils zwei Drittel wurden sequenziert.

3. 17. Gelfiltration zur Isolierung der großen tryptischen Peptide

1 mg Protein Cpl L12 wurde nach Verdauung mit Trypsin (siehe 3.15.1.1.) lyophilisiert und in 200 µl 10% Essigsäure aufgenommen. Die Trennung der Peptide erfolgte auf einer 1 x 180 cm grossen Säule aus Sephadex G 75 (siehe auch 3.6.). Fließmittel war 10% Essigsäure, Fließgeschwindigkeit 6 ml/Std., es wurden Fraktionen à 0,5 ml gesammelt, die mit einem Übersichtschromatogramm und durch N-terminale Aminosäurebestimmung untersucht wurden. Für das Übersichtschromatogramm wurde im Abstand von 1 cm ein Aliquot aus jeder dritten Fraktion auf Polygran CEL 300-Dünnschichtplatten aufgetragen. Nach aufsteigender Chromatographie im PBEW-System (3.16.1.) wurden die Platten mit Ninhydrin gefärbt. Aus der Mobilität und den N-terminalen Aminosäuren konnten die Fraktionen mit den getrennten großen tryptischen Pepti-

den T1 und T3 festgelegt werden. Die nachfolgenden Fraktionen mit den kleinen tryptischen Peptiden wurden ebenfalls vereinigt und die Peptide wie in 3.16. aufgetrennt und extrahiert.

Für die verschiedenen enzymatischen Nachspaltungen der tryptischen Peptide von Cpl L12 waren zwei Präparationen auf dieser Säule notwendig.

3. 18. Mikrosequenzierung mit DABITC/PITC-Doppelkupplungsmethode

Der schrittweise N-terminale Abbau von Aminosäuren wurde von Edman (1949) beschrieben. Zur Bestimmung der Aminosäuresequenzen von Peptiden und vom NH_2-Terminus des intakten Proteins wurde die von Chang et al. (1978) beschriebene Methode verwendet, bei der das herkömmliche Kupplungsreagenz PITC (Phenylisothiocyanat) durch ein farbiges Analogon DABITC (4 N-Dimethylaminoazobenzol-4'isothiocyanat) ersetzt ist. Die so abgebauten Aminosäuren können nach Konvertierung durch Chromatographie direkt nachgewiesen werden. Eine Hydrolyse wie bei dem Dansyl-Edman-Abbau (Grey und Harley 1963) entfällt. Die Nachweisgrenze der DABTH-Aminosäuren auf Polyamiddünnschichtplatten liegt im Pikomolbereich. Da die Reaktion mit DABITC allein keine vollständige Kupplung ergibt, wird die Kupplungsreaktion mit PITC vervollständigt (Doppelkupplung).

Der Abbau erfolgt nach folgendem Prinzip: Zuerst findet eine Kupplung der N-terminalen Aminosäuren (auch der Aminogruppen von Lysinresten) mit DABITC im alkalischen Medium statt. Die Abspaltung der DABITC-Derivate erfolgt im wasserfreien sauren Medium. Es bilden sich DAB-Thiazolinole. Nach Extraktion der DAB-Thiazolinole mit organischen Lösungsmitteln erfolgt eine Umlagerung zu roten DABTH-Aminosäuren in wässriger Säure. Die DABTH-Aminosäuren werden nach zweidimensionaler Chromatographie auf Polyamiddünnschichtplatten nachgewiesen. Parallel dazu vollzieht sich ein wie oben beschriebener Edman-Abbau durch Zugabe von PITC nach der Kupplungsreaktion. Bild 3 zeigt den Reaktionsablauf des manuellen Mikro-Edman-Abbaus mit DABITC.

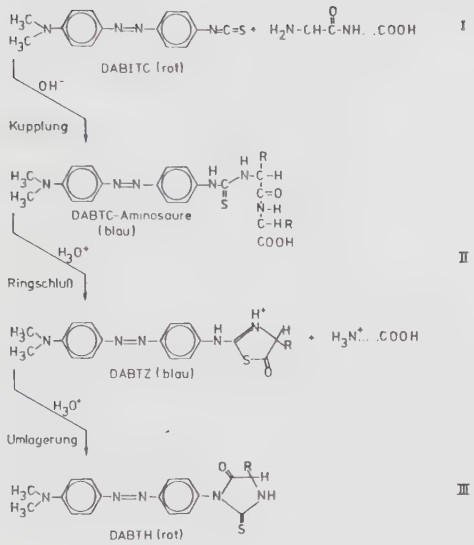


Bild 4 : Reaktionsablauf des manuellen Mikro-Edman-Abbaus mit DABITC.

3. 18. 1. Abbau der N-terminalen Aminosäuren mit DABITC/PITC

Proteine oder Peptide (1-10 nmol) wurden in 80 μl 50% wässrigen Pyridin mit 400 nmol DABITC (Fluka) in 40 μl Pyridin bei 52°C inkubiert. DABITC wurde in Aceton umkristallisiert und vor Gebrauch frisch in Pyridin gelöst. Nach 40 Min. wurden 10 μl PITC (Fluka) zugegeben und die Inkubation zur Absättigung 30 Min. fortgesetzt. Überschüssiges Reagenz und Nebenprodukte wurden dreimal mit 500 μl Heptan/Äthylessigesther (2:1) extrahiert. Nach Trocknen wurde die DABITC/PITC-Derivate 15 Min. bei 50°C

in 50 µl Trifluoressigsäure abgespalten. Danach wurde die Probe in 30 µl H_2O aufgenommen und Thiazolinole zweimal mit 50 µl Butylessigesther extrahiert. Nach Trocknen der wässerigen Phase wurde der nächste Abbauzyklus durchgeführt.

3. 18. 2. Nachweis der DAB-Aminosäuren

Nach Trocknen wurden die DAB-Thiazolinole in 30 µl 40% wässeriger Trifluoressigsäure zu DAB-Hydantoinen umgelagert. Inkubation 50°C, 50 Min. Nach Trocknen wurden die Proben in 4 µl Äthanol gelöst und auf 2,5 x 2,5 cm großen Polyamidplatten zweidimensional aufsteigend chromatographiert. Fließmittel für die erste Dimension war 33% Essigsäure, für die zweite Dimension Toluol:N-Hexan :Essigsäure=2:1:1. Als Referenz diente DABTC-Diäthylamin und DABTC-Äthanolamin. Die Platten wurden über rauchender HCl entwickelt, wobei sich Aminosäurederivate rot färben, die Referenz- und Nebenprodukte blau. Die Positionen der einzelnen DABTH-Aminosäuren sind in Bild 5 wiedergegeben.

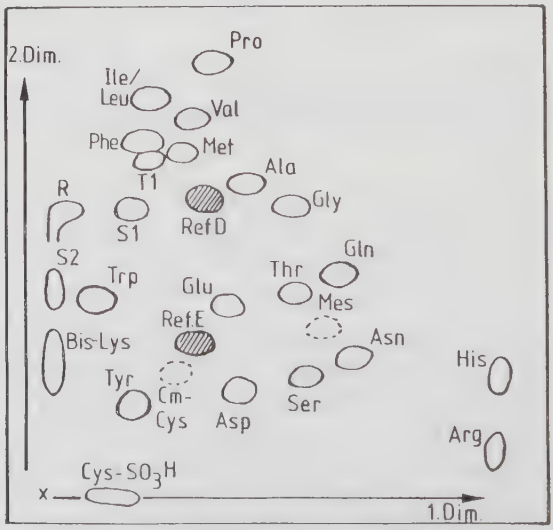


Bild 5: Chromatogramm mit den Positionen der DABTH-Aminosäuren.

Einige Aminosäuren treten in verschiedenen Derivaten auf und zeigen deshalb mehrere Flecken. Serin kommt als DABTH-Serin,DABTH-Dehydroserin, polymerisiertes Serin und hydrolysiertes Dehydroserin vor. Threonin gibt als einzige Aminosäure einen langgezogenen blauen Streifen unter dem Auftragspunkt, als weiteres Produkt ist Dehydrothreonin (rot) nachweisbar. Die Unterscheidung von Isoleucin und Leucin gelang durch Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Peptide.

3. 19. Manuelle Festphasensequenzierung

Mit der in 3.18. beschriebenen Sequenzierungsmethode können mit 10 nM Peptid 10-20 Abbauschritte durchgeführt werden. Bei hydrophoben Peptiden können die Verluste, die bei der Extraktion des überschüssigen Reagenz' mit Heptan entstehen, sehr groß sein, so daß nur einige wenige Aminosäuren eines größeren Peptids nachweisbar sind. Bei solchen Peptiden ist es sinnvoll, sie an ein festes Trägermaterial zu kuppeln. Je nach Größe des Peptids und C-terminaler Aminosäure sollten zur Kupplung an einen Träger verschiedene Methoden verwendet werden (Wittmann-Liebold 1981). Das C-terminale tryptische Peptid T12 in Cpl L12 wurde an Aminopolystyren mit Carbodiimid (EDC) gekoppelt (Salnikow et al. 1981) und manuell sequenziert (Chang 1979).

3. 20. Sekundärstrukturvorhersage von Protein Cpl L12

Zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Protein Cpl L12 wurde ein neues Fortran-Programm mit Algorithmen nach Burgess et al. (1974), nach Chou und Fassmann (1977,1978), Nagano (1977) und nach Robson und Suzuki (1976) verwendet. Diese statistischen Methoden wurden durch Vergleich der Daten solcher Proteine entwickelt, bei denen sowohl die Primärstrukturen bekannt sind als auch Sekundär- und Tertiärstrukturen röntgenologisch aufgeklärt wurden.

4. Isolierung und Charakterisierung von Ribosomen aus Spinat

Die Isolierung größerer Mengen von Ribosomen aus Zellorganellen ist wesentlich zeitraubender als die Gewinnung von Ribosomen aus Bakterien oder aus dem Cytoplasma von Eukaryonten. Hauptproblem bei der Isolierung von Ribosomen aus Chloroplasten ist die Fragilität der Zellorganellen. Durch Fragmentierung von Chloroplasten beim Aufbrechen der Zellen und während der Zentrifugationen und Resuspension geht ein erheblicher Teil der Ribosomen verloren. Um die für die Durchführung der vorliegenden Arbeit nötige, große Menge Chloroplastenribosomen mit einem vertretbaren Zeitaufwand isolieren zu können, mußten beschriebene Methoden zur Isolation von Chloroplasten vereinfacht werden (siehe Kap. 3). Dies wurde erreicht durch Reduktion aller verwendeten Puffervolumina und Reduktion der Zentrifugationsschritte zur Isolierung von Chloroplasten. Als Ausgangsmaterial wurde Spinat (Spinacia oleracea) wegen des großen Gehalts an Chloroplasten gewählt.

4. 1. Chloroplastenpräparation, Ausbeute, Chlorophyllbestimmung und bakterielle Kontamination

Die Chloroplasten wurden nach Aufbrechen der Zellen durch Filtration des Zellsaftes und Zentrifugation desselben erhalten. Eine zweite Zentrifugation diente zur Gewinnung gewaschener Chloroplasten. Die Abtrennung von Zellkernen durch Zentrifugation wurde nicht durchgeführt,da mit dem Zellkernsediment ca. 30-50% der Chloroplasten verloren gingen. Mehrmaliges Waschen von Chloroplasten, um 80S-Ribosomen zu entfernen, erwies sich als über-

flüssig.

Typische Präparationen nach der in Kapitel 3 beschriebenen Methode ergaben ca. 12-15 g Chloroplastensediment (feucht) und 300-400 mg Chlorophyll pro kg homogenisierter Spinatblätter.

Auf Bacto-Trypton-Hefeextrakt-Agarplatten bildeten sich 5-8 x 10^6 Bakterienkolonien pro kg homogenisierter Blätter. Diese Bakterienzahl ist erheblich geringer als die von Grivell und Groot (1972) angegebene und kann keine mit üblichen Methoden nachweisbare Kontamination mit bakteriellen Ribosomen hervorrufen.

4. 2. Chloroplastenribosomen

Chloroplastenribosomen wurden aus Chloroplasten nach deren Lyse durch Ultrazentrifugation erhalten.

4. 2. 1. Ausbeute, präparierte Menge

Pro kg homogenisierter Blätter konnten 15-60 mg Ribosomen isoliert werden (200-1000 $A_{260\ Rib}$). Die erzielte Ausbeute ist somit etwa zehnmal höher als in der Literatur angegeben (Grivell und Groot 1972). Zur Präparation von ca. 4,5 g Chloroplastenribosomen wurde etwa eine Tonne Spinat aufgearbeitet.

Auch mit der hier angewandten Methode verliert ein großer Teil der Chloroplasten schon vor der ersten Zentrifugation seine Ribosomen (> 50%). Dies ist im Sedimentationsprofil des Überstandes, der nach der ersten Chloroplastenzentrifugation entsteht, ersichtlich (Bild 7). Durch Anwendung kürzerer Zeiten für das Homogenisieren der Blätter konnte die Fragmentierung der Chloroplasten nicht verringert werden. Lyse der Chloroplasten mit anderen Konzentrationen von Triton X 100 (0,5%, 1%, 4%) oder mit Desoxycholat (0,5%), das bei der Isolierung von Ribosomen aus bspw. Rattenleber verwendet wird, steigerte die Ausbeute nicht, ebenso wie die Anwendung von DNAase, womit bei der Isolierung von bakteriellen Ribosomen durch Spaltung der DNS die Ribosomenausbeute gesteigert wird.

4. 2. 2. Kontamination mit nicht-ribosomalen Proteinen

Im Gegensatz zur Isolierung bakterieller Ribosomen erwies es sich zur Isolierung der Chloroplastenribosomen als notwendig, bei der Ultrazentrifugation ein Rohrzuckerkissen zu verwenden und die Zentrifugationsbedingungen genau einzuhalten. Die Ribosomenpräparationen enthalten sonst erhebliche Mengen Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase. Einige der im Bild 6 gezeigten Chloroplastenpräparationen sind mit großen Mengen dieses Enzyms kontaminiert.

Typische Präparationen der Chloroplastenribosomen waren leicht grünlich,und die UV-Absorption ergab ein Verhältnis A_{280}/A_{260} = 0,53-0,56. Dies bedeutet eine nur geringe Verunreinigung der Ribosomen mit nicht-ribosomalen Proteinen (siehe Kap. 3).

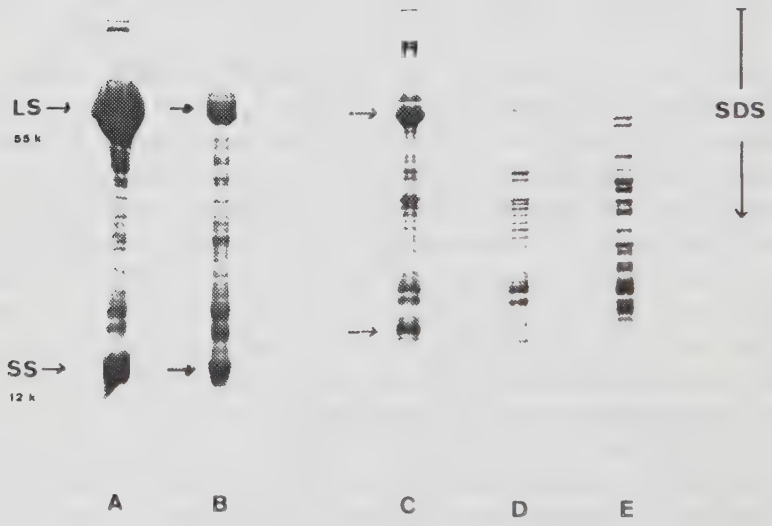


Bild 6: Elektropherogramm, 15% SDS-Polyacrylamidgel. Verschiedene Ribosomenpräparationen aus Spinat. (A) 60µg Spinatchloroplastenribosomen, die massiv mit Ribulose-1,5-Bisphospatcarboxylase (LS und SS) kontaminiert sind. A_{280}/A_{260} = 0,75. Die Ribosomen wur-

den wie bei Standardpräparationen isoliert, die Ultrazentrifugation erfolgte jedoch bei 140000 x g. (B) Spinatchloroplastenpräparation mit A_{280}/A_{260} = 0,62. (C) Spinatchloroplastenribosomen, Standardpräparation A_{280}/A_{260} = 0,56. (D) dto., A_{280}/A_{260} = 0,52. (E) 80S-Ribosomen, Spinatcytoplasma.

4. 2. 3. Kontamination mit 80S-Ribosomen

Die Kontamination der Chloroplastenribosomen mit 80S-Ribosomen des Cytoplasmas wurde mit analytischen Rohrzuckerdichtegradienten untersucht. Das Sedimentationsprofil ergab eine nur geringe, zu vernachlässigende Verunreinigung mit 80S-Ribosomen (Bild 7).

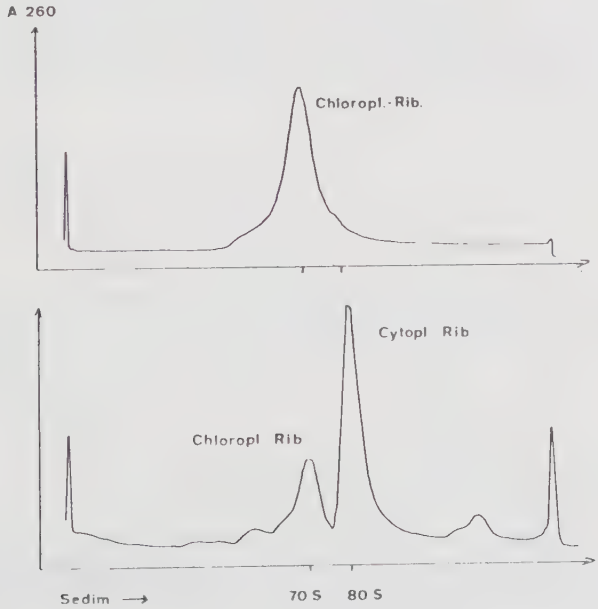


Bild 7: Sedimentationsprofil von jeweils 60 μg Spinatribosomen. (A) 70S-Chloroplastenribosomen. (B) Der Überstand nach Chloroplastenzentrifugation mit 80S-Ribosomen (Cytoplasma) und 70S-Ribosomen aus fragmentierten Chloroplasten. Beckman SW 60 Ti-Rotor, Zentrifugation 75 Min. mit 50000 UpM bei 4°C. Linearer Gradient mit 10-30% Rohrzucker in Puffer A (siehe 3.1.1.). Die

UV-Absorption wurde bei 260 nm aufgezeichnet und die Gradienten mit einem Isco-Gradientenanalysegerät fraktioniert. Zur Bestimmung der S-Werte wurden als Referenz Ribosomen aus E. coli verwendet.

4. 2. 4. Trennung der Untereinheiten

Chloroplastenribosomen konnten im Gegensatz zu E. coli-Ribosomen in Rohrzuckerdichtegradienten mit 10 mM Tris-HCl, 5o mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ nur unvollständig in Untereinheiten getrennt werden.

Optimale Bedingungen zur Dissoziation der Chloroplastenribosomen wurden mit analytischen Gradienten erprobt. Zur Präparation der Untereinheiten wurde Zonalzentrifugation in Gradienten mit Phosphatpuffer und geringer Magnesiumkonzentration angewendet. Sie ergab die gewünschte Trennung der Untereinheiten der Chloroplastenribosomen. Sedimentationsprofile sind in Bild 8 und 9 wiedergegeben. Die S-Werte der Untereinheiten sind mit denen von E. coli identisch.

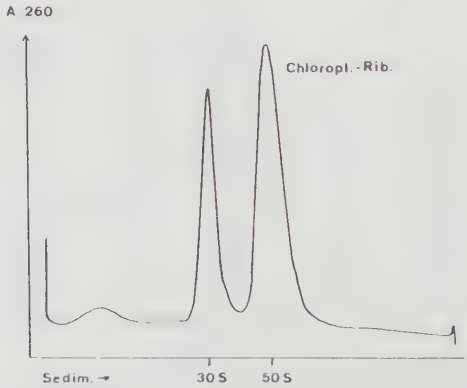


Bild 8: Sedimentationsprofil. Dissoziation von Chloroplastenribosomen in Untereinheiten. Beckman SW 60 Ti-Rotor, Zentrifugation 90 Min. mit 50000 UpM bei 4°C. Gradient mit 10-43% Rohrzucker in Puffer B (siehe 3.1.2.). Aufzeichnung der UV-Absorption siehe Text zu Bild 7.

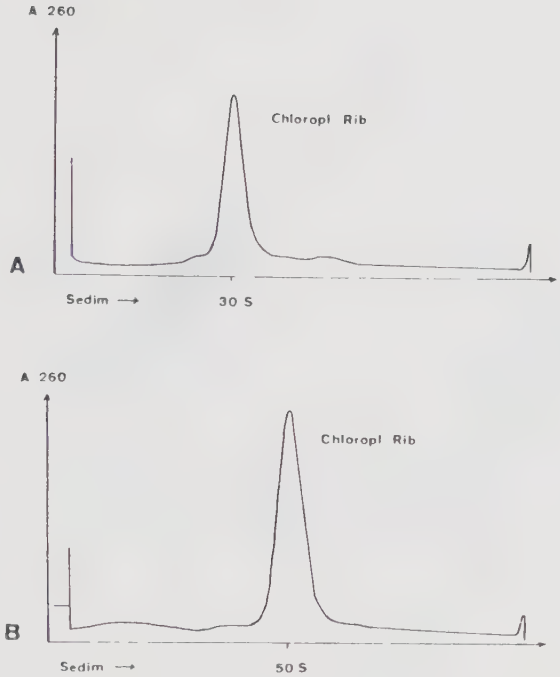


Bild 9: Sedimentationsprofil. Durch Zonalzentrifugation getrennte Untereinheiten der Chloroplastenribosomen. (A) 20 μg 30S-Untereinheiten. (B) 40 μg 50S-Untereinheiten. Bedingungen wie in Bild 8.

4. 3. Isolierung der cytoplasmatischen Ribosomen

Cytoplasmatische 80S-Ribosomen aus Spinat konnten, wie in Kapitel 3 beschrieben, aus dem Überstand, der nach Chloroplastensedimentation entstanden war, getrennt werden. Es ist jedoch einfacher, pflanzliche 80S-Ribosomen aus Keimlingen (z.B. Weizen oder Erbsen) zu gewinnen, da diese keine Chloroplasten besitzen und die Ausbeute an Ribosomen pro kg Pflanzenmaterial wesentlich höher ist.

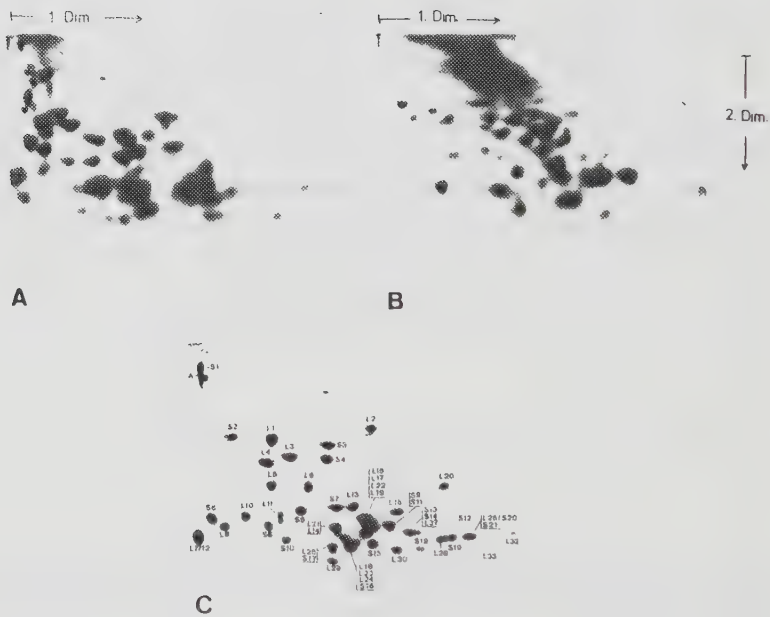


Bild 10: Elektropherogramme, Elektrophorese nach Mets und Bogorad. Trennung von 150 μg Protein aus 70- oder 80S-Ribosomen. (A) Spinatchloroplastenribosomen. (B) Cytoplasmatische Ribosomen aus Spinat. (C) Ribosomen aus E. coli.

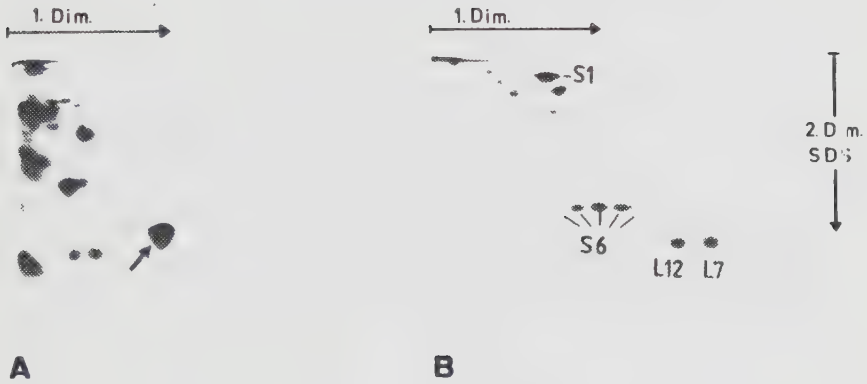


Bild 11: Elektropherogramme, Elektrophorese mod. nach Li und Subramanian. Selektive Darstellung der sauren Proteine aus 70S-Ribosomen. (A) Ribosomale Proteine aus Spinatchloroplasten. (B) Ribosomale Proteine aus E. coli.

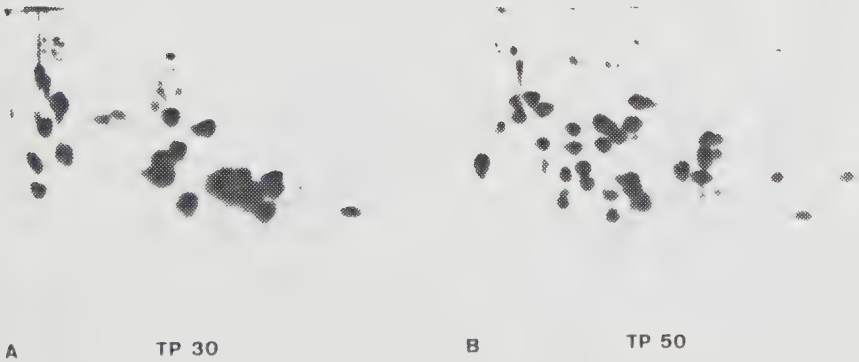


Bild 12: Elektropherogramme, Elektrophorese nach Mets und Bogorad. Auftrennung von ribosomalen Proteinen der 30- (A) und 50S- (B) Untereinheit aus Spinatchloroplasten.

Die Auftrennung der Proteine aus den ribosomalen Untereinheiten der Spinatchloroplasten ist in Bild 12 wiedergegeben. Die 30S-Untereinheit besteht aus mehr als 20 verschiedenen ribosomalen Proteinen, die 50S-Untereinheit aus mehr als 30 Proteinen.

In Bild 13 sind die ribosomalen Proteine nach Auftrennung im Elektrophoresesystem nach Geyl et al. dargestellt. Dieses Elektrophoresesystem ergibt für einige Proteine eine etwas bessere Auflösung als das System nach Mets und Bogorad. Da bei diesen beiden Systemen die erste Dimension der Elektrophorese identisch ist, können die Positionen vieler Proteine des einen Elektropherogramms denen des anderen zugeordnet werden.

Bild 13: Elektropherogramme, Elektrophorese nach Geyl et al. Auftrennung der ribosomalen Proteine aus Spinatchloroplasten. (A) Proteine aus 70S-Ribosomen. (B) Proteine aus 30S-Ribosomen. (C) Proteine aus 50S-Ribosomen.

4. 4. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophoresen von Proteinen aus Chloroplastenribosomen und deren Untereinheiten

Die Proteine der Chloroplastenribosomen wurden mit verschiedenen zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophoresesystemen untersucht. Bild 10 zeigt den Vergleich der Proteine der 70S-Chloroplastenribosomen aus Spinat mit denen der cytoplasmatischen 80S-Ribosomen aus Spinat und denen der 70S-Ribosomen aus E. coli im Elektrophoresesystem nach Mets und Bogorad (siehe Kapitel 3). Hierbei nehmen die Proteine der Chloroplastenribosomen ca. 45 verschiedene Positionen ein. Die Zahl ist ähnlich wie bei der Trennung der ribosomalen Proteine aus E. coli und geringer als die Zahl in 80S-Ribosomen.

Die Chloroplastenribosomen haben eine etwas größere Anzahl von sauren Proteinen (Proteine am linken Rand des Elektropherogramms) als E. coli. Auch die Zahl der größeren ribosomalen Proteine mit Molekulargewichten zwischen 25000 und 30000 scheint etwas höher als in E. coli zu sein. Insgesamt ist das Verteilungsmuster im Elektropherogramm der ribosomalen Proteine aus Chloroplasten jedoch dem der Proteine aus E. coli ähnlicher als dem der cytoplasmatischen 80S-Ribosomen. So fehlen in den 80S-Ribosomen saure Proteine, und das Molekulargewicht mehrerer Proteine aus 80S-Ribosomen liegt deutlich höher als in 70S-Ribosomen. Ob Ribosomen aus Chloroplasten und Ribosomen des Cytoplasmas gemeinsame Proteine besitzen, kann mit dem Elektropherogramm nicht mit Sicherheit entschieden werden.

Chloroplastenribosomen besitzen Proteine mit einer elektrophoretischen Mobilität, die für Protein L2 und L7/12 aus E. coli charakteristisch sind (Mache et al. 1980).

Alle, auch die sauren ribosomalen Proteine werden im Elektrophoresesystem nach Mets und Bogorad dargestellt. Das modifizierte Elektrophoresesystem nach Li und Subramanian (siehe Kapitel 3) zeigt, daß es keine weiteren, extrem sauren Proteine in Chloroplasten gibt. Mit diesem System können die sauren ribosomalen Proteine gut voneinander getrennt werden (Bild 11).

Der Vergleich von ribosomalen Proteinen aus Spinatchloroplasten mit denen der Chloroplasten aus Erbsen (Eneas-Filho 1981) und Tabak (Capel und Bourque 1982) zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster der Proteine bei der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese.

4. 5. Aminosäurezusammensetzungen von Spinatribosomen

Die durch Totalhydrolyse bestimmten Aminosäurezusammensetzungen der Ribosomen aus E. coli, Spinatchloroplasten, Spinatcytoplasma und Weizencytoplasma sind sehr ähnlich. Der Anteil an basischen Aminosäuren ist typischerweise hoch. Das Verhältnis von basischen zu sauren Aminosäuren (b/a) ist in den cytoplasmatischen 80S-Ribosomen etwas größer als in den 70S-Ribosomen aus Bakterien und Chloroplasten. Dies kann durch die geringere Zahl an sauren Proteinen in 80S-Ribosomen erklärt werden. Charakteristisch für ribosomale Proteine ist ein niedriger Wert für aromatische Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin). Die Aminosäurezusammensetzungen der verschiedenen 70- und 80S-Ribosomen sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Aminosäurezusammensetzungen (Mol%) verschiedener 70- und 80S-Ribosomen.

	70S E. coli	70S Spinat	80S Spinat	80S Weizen
$Asx^{p,a}$	8.3	7.6	7.6	8.1
Thr^{p}	5.2	4.6	7.1	4.3
Ser	4.4	4.5	4.8	4.7
$Glx^{p,a}$	10.1	9.9	7.2	8.9
Pro	3.7	5.0	5.6	4.4
Gly	8.2	18.8	14.7	14.8
Ala	11.6	8.3	10.0	9.0
Met	2.6	1.5	1.5	1.6
Val	9.7	6.0	7.7	7.2
Ile	5.5	5.7	5.3	4.3
Leu	7.5	8.1	7.8	7.2
Tyr	1.7	2.0	0.8	1.8
Phe	3.1	3.1	3.2	2.7
His^{p}	1.7	1.4	1.8	2.1
$Lys^{p,b}$	9.2	9.5	11.1	11.3
$Arg^{p,b}$	6.5	6.4	3.2	7.3
b/a	0.85	0.91	0.97	1.09
p	45.4%	43.9%	42.8%	46.7%

Tab. 3: Die Werte für die Ribosomen aus E. coli sind zitiert nach Spahr (1962). a, b und p bezeichnen saure, basische und polare Aminosäuren. Die Werte für Glycin können durch RNS überhöht sein.

4. 6. Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese mit Chloroplastenribosomen

Die Aktivität von Untereinheiten der Chloroplastenribosomen und von Hybriden mit Untereinheiten aus E. coli wurde durch Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Mit Translationsfaktoren (S100-Fraktion) aus E. coli konnte eine, wenn auch geringe Aktivität der Untereinheiten der Chloroplastenribosomen gezeigt werden. In Hybriden mit E. coli ist die Kombination mit Chloroplasten-50S-Untereinheiten wesentlich aktiver als die Kombination mit Chloroplasten-30S-Untereinheiten. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Grivell und Walg (1972) beschrieben.

Tab. 4: Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese mit Chloroplastenribosomen.

30S	50S	Poly(U)	^{14}C-Poly(Phe)	% des E. coli-Systems
E. coli	E. coli	+	27296 cpm	100 %
E. coli	E. coli	–	1124 cpm	
E. coli	Chloroplast	+	20896 cpm	75 %
E. coli	Chloroplast	–	1199 cpm	
Chloroplast	E. coli	+	6040 cpm	18 %
Chloroplast	E. coli	–	1238 cpm	
Chloroplast	Chloroplast	+	2564 cpm	5 %
Chloroplast	Chloroplast	–	1262 cpm	

5. Identifizierung und Isolierung des Proteins Cpl L12 aus Spinatchloroplasten

Die meisten ribosomalen Proteine sind basische Proteine. Im Gegensatz hierzu sind die ribosomalen "A-Proteine" saure Proteine. In Eubakterien entsprechen sie dem Protein L7/12 aus E. coli.

Die ribosomalen "A-Proteine" können wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften und ihrer Löslichkeit in 50% Äthanol relativ leicht isoliert werden. Im Gegensatz zu anderen ribosomalen Proteinen sind die Primärstrukturen dieser Proteine nicht nur von E. coli, sondern auch von verschiedenen anderen Organismen wie von Eubakterien,Archaebakterien und Eukaryonten ganz oder teilweise bekannt. Die ribosomalen "A-Proteine" eignen sich deshalb außerordentlich gut für vergleichende phylogenetische Untersuchungen. Nach der Isolation einer hinreichend großen Menge von Spinatchloroplastenribosomen sollte dieses Protein aus den 70S-Chloroplastenribosomen isoliert und sequenziert werden, um seine Struktur mit den bekannten Primärstrukturen anderer ribosomaler "A-Proteine" vergleichen zu können.

5. 1. Kreuzreaktion zwischen E. coli-L7/12 und einem Protein aus Ribosomen der Spinatchloroplasten

Einen Hinweis auf die Existenz des ribosomalen "A-Proteins" in Chloroplastenribosomen ergab die Austestung von Antiseren, die gegen einzelne Proteine aus E. coli entwickelt waren, auf Ouchterlonyplatten. Es konnte eine Kreuzreaktion zwischen Protein L7/12 aus E. coli und einem ribosomalen Protein aus Chlo-

roplasten beobachtet werden (Bild 14). Die Spornbildung der Präzipitationslinie weist auf eine Teilidentität der Antigene hin. Diese Kreuzreaktion wurde auch mit 50S-Untereinheiten erhalten.

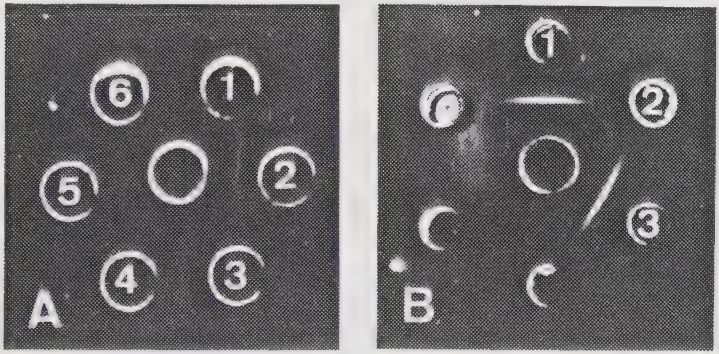


Bild 14: Immunodiffusogramme, radiale Doppeldiffusion nach Ouchterlony. Immunologische Verwandtschaft zwischen einem ribosomalen Protein aus Chloroplasten und Protein L7/12 aus E. coli. (A) Mitte: 150 µg ribosomale Proteine aus Spinatchloroplastenribosomen, außen: jeweils 60 µg Antiserum gegen Proteine aus E. coli. Bohrung 2 enthielt das Antiserum gegen E. coli-L7/12. Die anderen Bohrungen enthielten Seren gegen die Proteine S1, S6, NS1, NS2 und das groE-Protein. Sie ergaben keine Präzipitationslinie. (B) Mitte: Antiserum gegen Protein L7/12 aus E. coli, außen: Bohrung 1 und 3 enthielt 2 µg Protein L7/12 aus E. coli, Bohrung 2 enthielt 300 µg Protein aus Chloroplastenribosomen.

5. 2. Identifizierung von Cpl L12

Alle ribosomalen "A-Proteine" lassen sich mit der Methode nach Hamel et al. (1972, siehe Kap. 3) selektiv vom Ribosom abtrennen. Von allen ribosomalen Proteinen haben sie den niedrigsten isoelektrischen Punkt. Sie sind Bestandteil der 50S-Untereinheit und haben eine typische Aminosäurezusammensetzung (siehe unten), die sie von anderen ribosomalen Proteinen unterscheidet.

Aufgrund dieser typischen Eigenschaften ribosomaler "A-Proteine" konnte das Protein Cpl L12 aus Chloroplastenribosomen identifiziert werden.

5. 3. Isolierung von Cpl L12

Um das Protein L12 aus Chloroplasten zu isolieren, wurde die Methode nach Hamel et al. angewandt. Nach der Evaporation von Äthanol wurden drei Fraktionen mit Proteinen aus Chloroplastenribosomen erhalten: Fraktion 1 mit löslichem Extrakt, Fraktion 2 mit unlöslichem Extrakt und Fraktion 3 mit den Corepartikeln der extrahierten 70S-Ribosomen. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Die Elektropherogramme der Proteine aus den einzelnen Fraktionen sind in Bild 15 und 16 dargestellt.

Die Trennung und Untersuchung der präzipitierten, basischen Proteine aus Fraktion 2 und der Proteine aus den ribosomalen Corepartikeln (Fraktion 3) sind in Kapitel 7 beschrieben.

Fraktion 1 enthält ein extrahiertes Protein der 50S-Untereinheit mit dem niedrigsten isoelektrischen Punkt: Der Kandidat des zu isolierenden Proteins Cpl L12. Ein weiteres saures Protein der 50S-Untereinheit wurde teilweise extrahiert. Es entspricht möglicherweise E. coli-L10 und könnte als pentamerer Komplex ($L7/12_4L10$) extrahiert worden sein (Petersson und Liljas 1979).

Fraktion 1 enthielt darüberhinaus noch geringe Mengen weiterer ribosomaler und nicht-ribosomaler Proteine. Cpl L12 wurde deshalb durch Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellu-

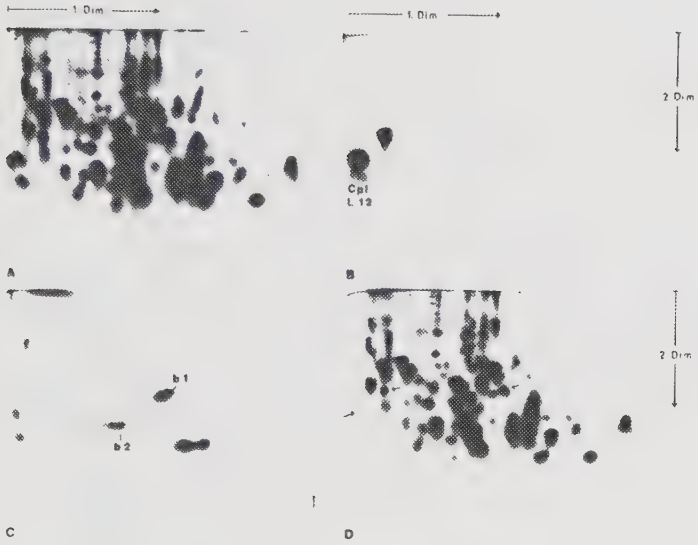


Bild 15: Elektropherogramme, 2D-Elektrophoresen nach Mets und Bogorad. (A) 150 µg Proteine aus Chloroplastenribosomen vor der Extraktion nach Hamel et al. (B) Fraktion 1, löslicher Extrakt mit Cpl L12. (C) Fraktion 2, Präzipitat mit Protein b1 und b2. (D) Fraktion 3, Proteine der 70S-Corepartikel.

Bild 16: Elektropherogramme, 2D-Elektrophorese nach Li und Subramanian. (A) Fraktion 1, löslicher Extrakt mit Cpl L12. (B) Fraktion 3, Proteine der 70S-Corepartikel. Das Protein Cpl L12 wurde vollständig mit der Methode nach Hamel et al. extrahiert.

lose aufgereinigt. Die Elution von Cpl L12 mit dem Salzgradienten erfolgte bei einer Kochsalzkonzentration von 0,07 M. Das Elutionsprofil ist in Bild 17 wiedergegeben. Das zweite Protein aus Fraktion 1 wurde nicht an den Ionenaustauscher gebunden. Identität und Homogenität des isolierten Proteins wurden durch ein- und zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophoresen überprüft. Die vereinigten Fraktionen zeigten keine Verunreinigungen des isolierten Proteins (Bild 18).

Dieses Protein kommt in den 80S-Ribosomen des Spinatcytoplasmas offensichtlich nicht vor (Bild 10). In Spinatchloroplasten kommt dieses Protein sehr wahrscheinlich nur in einer einzigen Form vor (Bild 11). In E. coli dagegen ist Protein L7 die N-terminal acetylierte Form von L12, daher sind zwei Proteinflecken bei der zweidimensionalen Elektrophorese zu sehen (Bild 11 B).

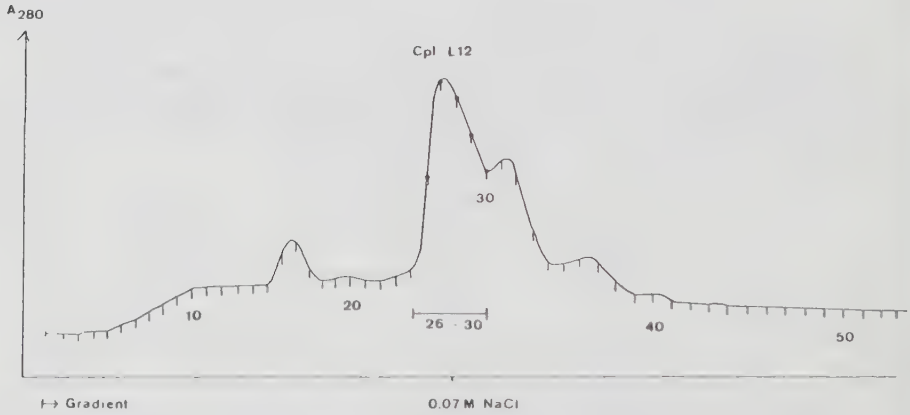


Bild 17: UV-Absorptionsprofil. Isolierung von Protein Cpl L12 durch Anionenaustauschchromatographie aus Fraktion 1.

Die Mobilität von Cpl L12 bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist etwas geringer als die von Lactoglobulin (Molekulargewicht 18500 Dalton). Tatsächlich jedoch hat Cpl L12 ein Molekulargewicht von nur 13576 Dalton. Wie bei vielen anderen

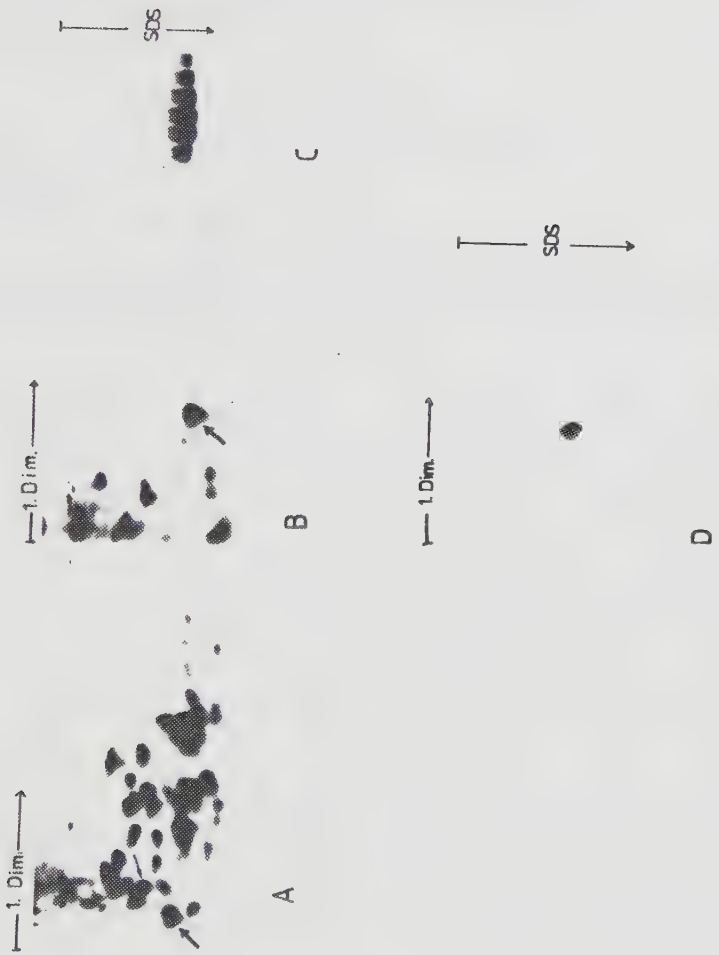


Bild 18: Elektropherogramme. Homogenität und Identität des isolierten ribosomalen Proteins Cpl L12. (A) Proteine der 70S-Spinatchloroplastenribosomen, Polyacrylamidgelelektrophorese nach Mets und Bogorad. (B) Trennung der sauren Proteine aus Chloroplastenribosomen, Polyacrylamidgelelektrophorese mod. nach Li und Subramanian. Der dicke Pfeil markiert jeweils die Position von Cpl L12 in beiden Gelsystemen. (C) Säulenfraktion mit Cpl L12, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, eindimensional, nach Laemmli. (D) Vereinigte Säulenfraktionen mit Protein Cpl L12, Gelsystem nach Li und Subramanian.

ribosomalen Proteinen ist die elektrophoretische Mobilität von Cpl L12 deutlich geringer als es seinem Molekulargewicht entspricht.

5. 4. Aminosäurezusammensetzung von Cpl L12

Die durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzung von Cpl L12 und der Vergleich mit ribosomalen "A-Proteinen" aus anderen Organismen ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Aminosäurezusammensetzung, insbesondere der relativ hohe Anteil an hydrophoben Aminosäureresten, ist ähnlich wie bei Protein L7/12 aus E. coli und den ribosomalen "A-Proteinen" aus anderen Organismen. Wie in diesen ribosomalen "A-Proteinen" ist Alanin die am häufigsten vorkommende Aminosäure. Cystein, Histidin, Tyrosin und Methionin fehlen in Cpl L12. Methionin kommt in den ribosomalen "A-Proteinen" einiger Bakterien vor. Tyrosinreste, die in den ribosomalen "A-Proteinen" aus Archaebakterien und Eukaryonten nachgewiesen werden konnten, kommen in Cpl L12 nicht vor.

Die Frage,ob das Protein Cpl L12 mit den ribosomalen "A-Proteinen" aus Eubakterien oder Eukaryonten näher verwandt ist, läßt sich Mithilfe der Aminosäurezusammensetzungen nicht beantworten.

Ein numerischer Parameter zum Vergleich von Proteinen aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzungen wurde von Cornish-Bowden (1980, 981) beschrieben. Die Differenz der Anzahl gleicher Aminosäurereste in zwei Proteinen wird hierzu nach Quadrierung summiert und durch die Anzahl der verglichenen Aminosäuren dividiert.

$$S = \frac{1}{2N} \sum (ni_A - ni_B)^2$$

N ist die Anzahl der Aminosäurereste des zu vergleichenden Proteins, ni_A und ni_B sind die Anzahl der einzelnen Aminosäurereste in den verglichenen Proteinen A und B. Ist der Wert kleiner als 0,42, so sind die Proteine sehr wahrscheinlich verwandt. Ist der Wert größer als 0,93, so sind die Proteine sehr wahrscheinlich nicht verwandt.

Die in Tabelle 5 in Mol% angegebenen Aminosäurezusammensetzungen wurden zur Errechnung des oben angegebenen Parameters in absolute Werte umgerechnet. Der Vergleich von Cpl L12 mit E. coli-L12 ergab einen Wert von 0,55, der Vergleich von Cpl L12 mit dem ribosomalen "A-Protein" aus Weizen-80S-Ribosomen den etwas höheren von 0,65. Beide Werte lassen nach den von Cornish-Bowden aufgestellten Kriterien keine Aussage über eine etwaige Verwandtschaft oder Nichtverwandtschaft zu.

Tab. 5: Aminosäurezusammensetzungen von Cpl L12 und anderen ribosomalen "A-Proteinen" in Mol%.

	Eubakterien		Archaebakterien		Eukaryonten		Chloroplasten-L12	
	E. coli	B. subt.	M. therm.	H. cut.	Weizen	A. salina	Total-hydrolyse	Sequenz
Asx	5.8	4.9	6.9	19.5	8.1	7.4	7.6	-
Asp	-	-	-	-	-	-	-	6.9
Asn	-	-	-	-	-	-	-	0.8
Thr	2.5	3.3	3.9	2.0	2.0	2.9	2.7	3.1
Ser	5.0	2.5	1.6	3.7	9.0	6.4	6.6	6.9
Glx	14.2	18.9	25.0	18.4	12.6	17.3	16.8	-
Glu	-	-	-	-	-	-	-	11.5
Gln	-	-	-	-	-	-	-	3.1
Pro	1.7	2.5	2.2	2.8	2.1	4.0	4.5	4.6
Gly	6.7	9.0	5.6	8.1	10.4	14.0	6.7	6.1
Ala	23.3	17.2	25.8	24.2	20.3	18.5	16.7	16.9
Val	13.3	11.5	5.8	6.1	5.0	2.4	8.4	10.0
Met	2.5	0	2.4	0.9	2.1	3.7	0	0
Ile	5.0	7.3	4.1	2.7	4.8	3.8	4.3	4.6
Leu	6.7	9.8	7.0	7.2	8.8	8.1	11.1	10.8
Tyr	0	0	2.0	1.8	2.0	1.7	0	0
Phe	1.7	1.6	1.4	0.8	3.5	1.4	1.6	1.5
His	0	0	1.1	0	0.2	0	0	0
Lys	10.8	10.7	3.6	1.0	8.0	8.0	10.7	10.0
Arg	0.8	0.8	1.9	0.9	1.4	0.7	2.4	2.3
Trp	0	0	ND	0	ND	0	ND	0.8
Cys	0	0	ND	0	ND	0	ND	0

Die Tabelle enthält die durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzung von Cpl L12 und die durch Sequenzierung erhaltenen Werte. Die Angaben für die ribosomalen "A-Proteine" aus Eubakterien, Archaebakterien und Eukaryonten sind zitiert nach Matheson et al. (1980).

5. 5. UV-Absorptionsspektrum von Cpl L12

Das UV-Absorptionsspektrum eines Proteins kann zur quantitativen Bestimmung des Gehalts an aromatischen Aminosäuren verwendet werden (siehe Kapitel 3). Das UV-Absorptionsspektrum von Cpl L12 in 0,02 M N-Methylmorpholinacetat (pH 8,1) ist in Bild 19 wiedergegeben. Cpl L12 hat demnach eine spezifische Extinktion $E_{280}^{1\%} = 4,5$. Die Aminosäureanalyse ergab, daß das Protein keinen Tyrosinrest enthält. Deshalb konnte aus der Konzentration des Proteins $C_{Prot} = 0,75$ mg/ml $\hat{=}$ 55×10^{-6} M, der gemessenen Absorption des Proteins $A_{280} = 0,33$ und der molaren Extinktion von Tryptophan $E_{280}^{Trp} = 5559$ Mol^{-1} cm^{-1} die Anzahl der Tryptophanreste im Protein ermittelt werden:

$$N_{Trp} = \frac{C_{Trp}}{C_{Prot}} = \frac{0,33 \times 10^6}{5559 \times 55} = 1,08$$

Das Protein enthält demnach einen Tryptophanrest.

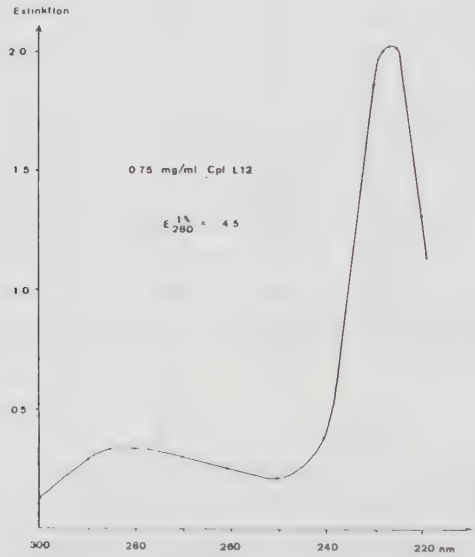


Bild 19: UV-Spektrogramm von Cpl L12.

5. 6. Stöchiometrie von Cpl L12

Aus 1,2 g Ribosomen (20000 A_{260}) konnten 10 mg Protein Cpl L12 isoliert werden (Proteinbestimmung nach Lowry und durch Totalhydrolyse).

Die isolierte Menge Cpl L12 entspricht 1,6 Mol pro Mol Ribosom. Da die Ausbeute bei der Isolierung des Proteins wahrscheinlich weniger als 50% betrug, ist es möglich, daß L12 in Chloroplasten wie die Proteine L7/12 in E. coli in vier Kopien auf dem Ribosom vorkommt (Subramanian 1975). Die genaue Stöchiometrie müßte jedoch mit anderen Methoden (z.B. Radioimmunoassay) bestimmt werden.

6. Primärstruktur von Cpl L12

6. 1. Strategie zur Aufklärung der Primärstruktur

Die Primärstruktur von Cpl L12 wurde durch manuellen Mikro-Edman-Abbau mit dem neuen Reagenz DABITC vollständig bestimmt.

Der N-Terminus des Proteins Cpl L12 war nicht blockiert. Die ersten neun Aminosäuren wurden durch Sequenzierung des intakten Proteins ermittelt.

Aminosäuren am C-Terminus von Cpl L12 wurden mit Carboxypeptidase A und durch Sequenzierung des einzigen tryptischen Peptids, das weder Lysin noch Arginin enthielt und deshalb das C-terminale Peptid sein mußte, bestimmt.

Zur Aufklärung der internen Aminosäuresequenzen wurde das Protein enzymatisch mit TPCK-Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und Staphylococcus aureus-Protease gespalten. Die so erhaltenen Peptide wurden elektrophoretisch und chromatographisch auf Dünnschichtplatten zweidimensional getrennt und dann eluiert. Nach Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung durch Totalhydrolyse wurden die Aminosäurereste der Peptide so weit wie möglich abgebaut und bestimmt. Die Reihenfolge aller tryptischen Peptide konnte durch die oben genannten vier enzymatischen Spaltungen eindeutig festgelegt werden, da die so erhaltenen Partialsequenzen aufgrund ihrer Überlappungen die Rekonstruktion ermöglichten. Innerhalb der tryptischen Peptide T1 und T3 waren einige Aminosäurereste nach den vier enzymatischen Spaltungen noch nicht eindeutig bestimmt. Deshalb war es notwendig, die beiden großen tryptischen Peptide (T1 und T3) durch Gelfiltration zu isolieren und enzymatisch nachzuspalten.

Da zur Aufklärung der Primärstruktur von Cpl L12 nur insgesamt 10 mg Protein zur Verfügung standen, mußten die

zur Verfügung stehenden proteinchemischen Methoden möglichst effektiv eingesetzt werden.

Eine detaillierte Darstellung der verwendeten experimentellen Methoden und Bedingungen für die enzymatischen Spaltungen, Peptidtrennungen, Aminosäureanalysen und den Mikro-Edman-Abbau sind in Kapitel 3 beschrieben.

Peptide wurden nach den Enzymen, mit denen sie erhalten wurden, und nach ihrer Reihenfolge im Protein benannt. Die Positionen der einzelnen Peptide nach Auftrennung auf Dünnschichtplatten und ihre durch Totalhydrolyse bestimmten Aminosäurezusammensetzungen sind aus den Tabellen 6-12 und beigefügten Chromatogrammen ersichtlich. Alle gefundenen Peptide, ihre Reihenfolge im Protein Cpl L12 und die Angaben, wie weit die Peptide abgebaut werden konnten, sind in Bild 19 zusammengefaßt.

Im folgenden sind Einzelheiten der enzymatischen Spaltungen beschrieben.

6. 2. Bestimmung des C-Terminus mit Carboxypeptidase

Die Kinetik der mit Carboxypeptidase A freigesetzten Aminosäuren ist in Bild 18 dargestellt. Nach Inkubation von 10 Min. war hauptsächlich Valin, etwas Isoleucin und sehr wenig Serin freigesetzt. Nach 20 Min. war der Wert von Isoleucin und Serin deutlich gestiegen. Der Wert nach 40 Min. zeigt ein weiteres Ansteigen von Valin.

Da Carboxypeptidase A Aminosäurereste vom C-terminalen Ende her abbaut, ergab sich folgende Sequenz: Val-Ser-Ile-Val-COOH. Diese ist in Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des tryptischen Peptids T12 (siehe unten). Weitere Aminosäuren konnten im Aminosäureanalysator nicht nachgewiesen werden. Der vorangehende Aminosäurerest Lysin wurde durch Carboxypeptidase A nicht oder nur sehr langsam abgebaut, da dieser basisch ist.

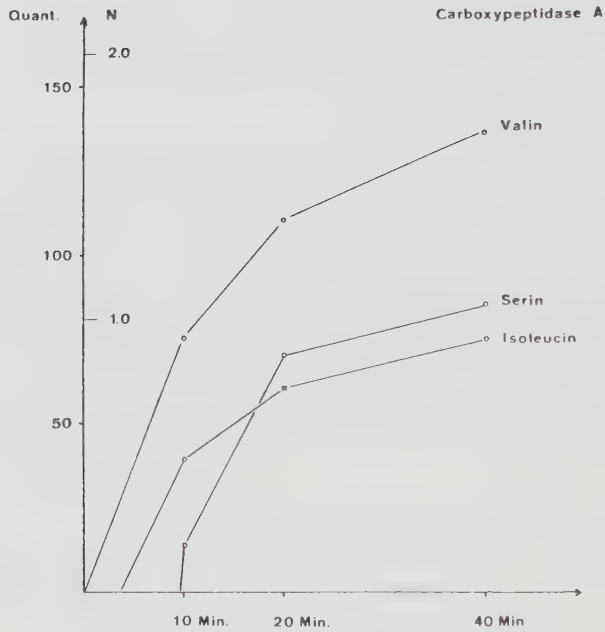


Bild 18: Abspaltung von C-terminalen Aminosäuren von Cpl L12 mit Carboxypeptidase A. Dargestellt ist die Kinetik der mit Carboxypeptidase A freigesetzten Aminosäuren. Quant. bezeichnet die im Aminosäureanalysator nachgewiesene Menge an Aminosäuren, Quant. 100 = 2,5 nM. N bezeichnet die Anzahl der freigesetzten Aminosäurereste pro Molekül Cpl L12.

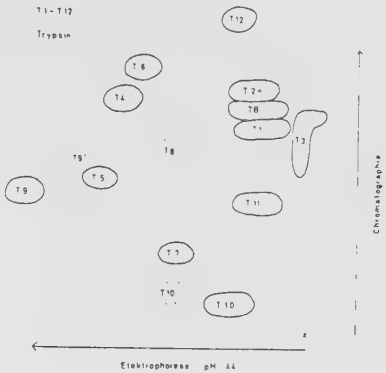
6. 3. Enzymatische Spaltungen des intakten Proteins

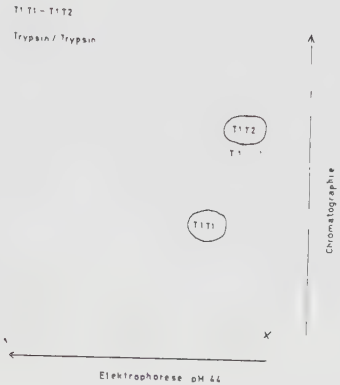
6. 3. 1. Spaltung mit Trypsin

Die Spaltung von Cpl L12 mit Trypsin ergab zwölf Peptide (T1-T12), die aneinandergereiht die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins ausmachen. Zusätzlich entstanden durch unvollständige Spaltung drei weitere Peptide T8', T9' und T10', die sich

Tab. 6: Durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzungen der nach Spaltung mit Trypsin entstandenen Peptide von Cpl L12.

Peptid	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T8'	T9'	T10'	T1T1	T1T2
Pos.	1-24	25-33	34-75	76-80	81-83	84-91	92-94	95-102	103-105	106-118	119-126	127-130	95-103	104-105	104-118	1-7	8-24
N-Term.	Ala	Val	Leu	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Gln	Val	Glu	Leu	Leu	Ala	Ile
Asx	-	2.0(2)	4.0(4)	-	-	-	-	-	-	3.2(3)	1.0(1)	-	-	-	(3)	-	-
Thr	2.3(2)	-	0.8(1)	-	-	1.0(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7(2)
Ser	1.0(1)	-	3.2(4)	0.8(1)	-	1.0(1)	-	-	-	1.1(1)	-	0.9(1)	-	-	(1)	-	1.1(1)
Glx	7.6(7)	1.6(1)	3.6(4)	-	-	-	1.3(1)	2.5(2)	-	2.5(2)	2.4(2)	-	1.7(2)	-	(2)	2.1(2)	5.3(5)
Pro	1.4(1)	-	4.0(4)	-	-	-	-	1.3(1)	-	-	-	-	0.8(1)	-	-	1.4(1)	-
Gly	2.5(2)	-	2.0(2)	-	-	1.3(1)	-	1.0(1)	-	1.1(1)	1.1(1)	-	1.2(2)	-	(1)	-	2.2(2)
Ala	5.6(3)	-	11.8(12)	-	0.9(1)	1.1(1)	1.0(1)	-	-	1.5(2)	1.8(2)	-	-	-	(2)	1.6(2)	1.3(1)
Val	2.0(1)	2.3(2)	4.5(5)	1.1(1)	1.0(1)	-	-	-	-	1.0(1)	-	2.0(2)	-	-	(1)	0.9(1)	-
Ile	0.9(1)	-	1.1(1)	-	-	-	0.7(1)	-	-	-	-	1.0(1)	0.9(1)	-	-	-	0.6(1)
Leu	3.4(4)	1.6(2)	1.0(1)	-	-	3.3(3)	-	1.5(2)	1.0(1)	-	0.5(1)	-	1.8(2)	0.8(1)	(1)	-	3.8(4)
Phe	-	-	2.4(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	1.0(1)	0.9(1)	1.1(1)	1.0(1)	-	1.0(1)	1.1(1)	0.8(1)	2.0(2)	2.9(3)	0.6(1)	-	2.0(2)	1.1(1)	(4)	0.7(1)	-
Arg	0.9(1)	-	1.2(1)	-	1.0(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9(1)
Trp	-	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	(24)	(9)	(42)	(5)	(3)	(8)	(3)	(8)	(3)	(13)	(8)	(4)	(9)	(2)	(15)	(7)	(14)





T1T1 und T1T2 sind Peptide, die durch Nachspaltung des isolierten Peptids T1 erhalten wurden. (Pos.) ist die Position des jeweiligen Peptids innerhalb der Aminosäuresequenz von Cpl L12. (N-Term.) bezeichnet die jeweilige N-terminale Aminosäure. In Klammern steht die Anzahl der Aminosäurereste, die sich aus der Sequenz des Proteins Cpl L12 ergeben. Nebenstehend die Peptidkarten mit den Positionen aller tryptischen Peptide. (+) Positive Farbreaktion bei Tryptophannachweis mit Ehrlichschem Reagenz.

von den Peptiden T8, T9 und T10 ableiten (siehe Bild 19). Aminosäurezusammensetzungen der tryptischen Peptide von Cpl L12 sind in Tabelle 6 angegeben, die Positionen dieser auf Dünnschichtplatten getrennten Peptide sind dem der Tabelle beigefügten Chromatogramm zu entnehmen. Der Tryptophanrest in Peptid T2 wurde mit Ehrlichschem Reagenz nachgewiesen.

Durch manuellen Mikro-Edman-Abbau der tryptischen Peptide konnten 78 der 130 Aminosäurereste des Proteins bestimmt werden. Die Aminosäuresequenzen der Peptide T2, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T11 und T12 wurden durch den N-terminalen Abbau vollständig bestimmt. Bei dem extrem hydrophoben Peptid T12 gelang dies jedoch erst nach Kupplung an einen Träger (Aminopolystyrol). Die Aminosäuresequenzen der Peptide T1, T3 und T10 konnten vor allem wegen deren Länge nur unvollständig bestimmt werden (max. 15 Schritte in Peptid T3).

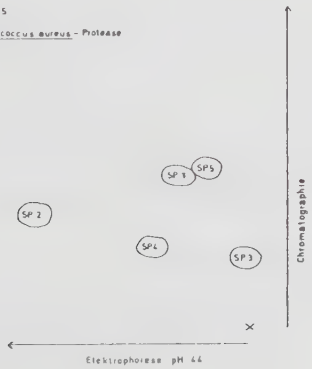
Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, sind die durch Totalhydrolyse bestimmten Aminosäurezusammensetzungen der meisten Peptide in sehr guter Übereinstimmung mit den Werten, die sich aus der Primärstruktur von Cpl L12 ergeben. Der Wert für Glutaminsäure ist in einigen Analysen etwas zu hoch. Dies könnte ein Eichfehler bei dem benutzten Aminosäureanalysator sein. Relativ schlecht stimmen die Alaninwerte des Peptids T1. Obwohl das Peptid T1 zur Hydrolyse durch Gelfiltration und auf Dünnschichtplatten getrennt wurde, ist es sehr wahrscheinlich mit kleinen Mengen von Peptid T3 (29 Mol% Alanin) kontaminiert. Die Aminosäurezusammensetzungen der beiden tryptischen Peptide von T1 (T1T1 und T1T2) sind dagegen in guter Übereinstimmung mit den Werten, die sich aus der Primärstruktur von Cpl L12 ergeben.

Einige Peptidbindungen hinter Lysin wurden mit Trypsin nicht gespalten (Lys7 in T1, Lys60 in T3, Lys110 und Lys117 in T10). Die nicht oder nicht vollständig gespaltenen Peptidbindungen befinden sich entweder in der Nähe negativ geladener Aminosäuren (z.B. Glu-Lys oder Lys-Asp-Asp) oder sind Peptidbindungen zwischen zwei benachbarten Lysinen. Bei einem höheren Enzymsubstratverhältnis konnte das Peptid T1 mit Trypsin nachgespalten werden (s.u.).

Tab. 7: Durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzungen der nach Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease entstandenen Peptide von Cpl L12.

Peptide	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5
Pos.	93-98	99-106	107-114	115-121	122-130
N-Term.	Ala	Gly	Gly	Asp	Asp
Asx	-	-	1.5(2)	0.8(1)	1.1(1)
Thr	-	-	-	-	-
Ser	-	-	1.1(1)	-	1.0(1)
Glx	2.0(2)	1.4(1)	1.2(1)	2.3(2)	-
Pro	-	1.3(1)	-	-	-
Gly	-	1.1(1)	1.0(1)	-	1.1(1)
Ala	0.7(1)	-	1.1(1)	0.9(1)	2.0(2)
Val	-	-	0.7(1)	-	1.8(2)
Ile	1.0(1)	-	-	-	0.7(1)
Leu	0.8(1)	2.1(2)	-	1.0(1)	-
Phe	-	-	-	-	-
Lys	0.6(1)	2.7(3)	0.7(1)	1.9(2)	1.1(1)
Arg	-	-	-	-	-
Trp	-	-	-	-	-
Summe	(6)	(8)	(8)	(7)	(9)

Die unten stehende Abbildung gibt die Positionen der durch Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease entstandenen Peptide auf der Peptidkarte wieder.



6. 3. 2. Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease

Nach der Spaltung von Cpl L12 mit Staphylococcus aureus-Protease (spezifische Spaltung hinter Glutaminsäureresten) entstand ein in Wasser unlösliches Peptid mit den ersten 92 Aminosäuren (Ergebnis der Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren und Hydrolyse), das abzentrifugiert wurde.Der Überstand mit fünf Peptiden wurde nach Zentrifugation auf Dünnschichtplatten getrennt. Diese Peptide, SP1-SP5, lieferten wichtige Informationen über den C-Terminus von Cpl L12. Durch Bestimmung ihrer Aminosäuresequenzen konnte die Reihenfolge der tryptischen Peptide T7-T12 festgelegt werden. Außerdem ermöglichten die Peptide SP1-SP5, die Aminosäuresequenz von T10 zu vervollständigen.

Die durch Hydrolyse bestimmten Aminosäurezusammensetzungen der relativ kurzen Peptide SP5-SP7 sind in vollständiger Übereinstimmung mit den Werten, die sich aus der Primärstruktur von Cpl L12 ergeben (Tabelle 7). Da in SP5 keine Glutaminsäure nachgewiesen wurde, muß es notwendigerweise das C-terminale Peptid des Proteins sein.

6. 3. 3. Spaltung mit Pepsin

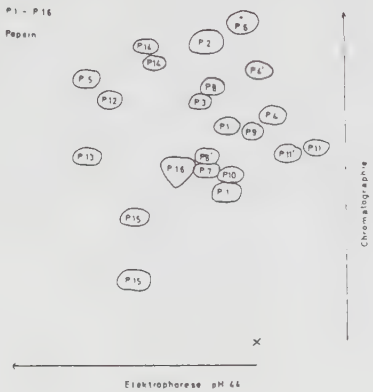
Die Spaltung von Cpl L12 mit dem relativ unspezifischen Enzym Pepsin ergab 16 Peptide (P1-P16) und weitere überlappende Peptide (P1'-P15'). Die Aminosäurezusammensetzungen der peptischen Peptide sind in Tabelle 8 angegeben, die Positionen dieser auf Dünnschichtplatten getrennten Peptide sind dem der Tabelle nebenstehenden Chromatogramm zu entnehmen. Der Tryptophanrest in Peptid P6 wurde mit Ehrlichschem Reagenz nachgewiesen.

Die peptischen Peptide ergaben die Reihenfolge der tryptischen Peptide T1-T8. Teilsequenzen innerhalb der großen tryptischen Peptide T1 und T3 wurden durch die Sequenzierung der peptischen Peptide erhalten. Die C-terminale Region von Cpl L12 ist gegen Pepsin resistent und ergibt das große Peptid P16.

Die Aminosäurebestimmungen aller peptischen Peptide sind in guter Übereinstimmung mit den Werten, die sich aus der Primär-

Tab. 8: Durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzungen der nach Spaltung mit Pepsin entstandenen Peptide von Cpl L12.

Peptide	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
Pos.	1-10	11-15	16-18	19-22	23-26	27-30	31-38	39-46	47-58	59-63	64-74	75-78	79-81	82-90	91-95	96-130
N-Term.	Ala	Leu	Ser	Thr	Ala	Val	Gln	Ala	Val	Lys	Asp	Arg	Ile	Val	Lys	Leu
Asx	-	-	-	-	-	1.0(1)	1.0(1)	-	1.1(1)	-	3.4(3)	-	-	-	-	4.4(4)
Thr	-	0.9(1)	-	1.0(1)	-	-	-	-	-	1.0(1)	-	-	-	0.7(1)	-	-
Ser	-	-	(1)	-	-	-	0.8(1)	(1)	-	-	2.1(2)	1.3(1)	-	0.9(1)	-	1.5(2)
Glx	4.4(4)	0.7(1)	-	2.0(2)	-	-	1.0(1)	-	1.2(1)	2.0(2)	0.9(1)	-	-	-	2.2(2)	5.4(5)
Pro	1.2(1)	-	-	-	-	-	-	(1)	1.9(2)	-	1.2(1)	-	-	-	-	1.3(1)
Gly	-	1.0(1)	(1)	-	-	-	1.2(1)	-	1.0(1)	-	-	-	-	1.3(1)	-	3.0(3)
Ala	1.6(2)	-	-	-	0.7(1)	-	1.3(1)	(5)	4.9(5)	-	1.0(1)	-	1.1(1)	1.2(1)	1.0(1)	3.7(4)
Val	0.7(1)	-	-	-	1.2(1)	1.1(1)	0.8(1)	-	1.6(2)	-	1.5(2)	1.2(1)	-	1.0(1)	-	2.6(3)
Ile	1.1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2(1)	0.9(1)	0.9(1)	-	-	1.7(2)
Leu	-	2.2(2)	(1)	1.2(1)	1.0(1)	1.0(1)	0.8(1)	-	-	-	-	-	-	2.9(3)	-	4.3(4)
Phe	-	-	-	-	-	-	-	(1)	-	1.0(1)	-	-	-	-	-	-
Lys	1.0(1)	-	-	-	-	-	1.0(1)	-	-	0.9(1)	-	-	0.9(1)	-	1.6(2)	6.8(7)
Arg	-	-	-	-	0.9(1)	-	-	-	-	-	-	0.7(1)	-	1.1(1)	-	-
Trp	-	-	-	-	-	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	(10)	(5)	(3)	(4)	(4)	(4)	(8)	(8)	(12)	(5)	(11)	(4)	(3)	(9)	(5)	(35)

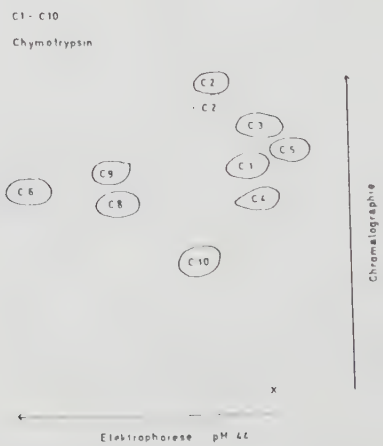


Die nebenstehende Abbildung gibt die Positionen der peptischen Peptide auf der Peptidkarte wieder (+) bezeichnet positive Farbreaktion bei Tryptophannachweis mit Ehrlichschem Reagenz.

Tab. 9: Durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzungen der durch Spaltung mit Chymotrypsin entstandenen Peptide von Cpl L12.

Peptide	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C9	C10	C2''
Pos.	1-15	16-26	27-41	42-63	64-79	80-85	89-96	97-104	105-130	19-26
N-Term.	Ala	Ser	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Ile	Lys	Thr
Asx	-	-	2.0(2)	1.2(1)	3.2(3)	-	-	-	3.5(4)	-
Thr	0.9(1)	1.0(1)	-	0.9(1)	-	-	-	-	-	1.0(1)
Ser	-	0.9(1)	1.7(2)	-	2.7(3)	-	-	-	1.9(2)	-
Glx	5.1(5)	2.0(2)	1.5(1)	3.2(3)	2.2(1)	-	2.6(2)	1.4(1)	4.8(4)	2.4(2)
Pro	1.0(1)	-	-	3.0(3)	1.2(1)	-	-	1.1(1)	-	-
Gly	1.0(1)	1.3(1)	1.2(1)	1.0(1)	-	-	1.4(1)	1.8(1)	2.4(2)	-
Ala	2.1(2)	0.7(1)	2.3(2)	9.0(9)	1.9(1)	1.7(2)	0.7(1)	-	4.4(4)	1.0(1)
Val	1.3(1)	0.7(1)	2.3(2)	2.5(2)	4.7(3)	1.0(1)	-	-	3.4(3)	1.0(1)
Ile	0.9(1)	-	-	-	2.8(3)	-	-	0.8(1)	0.8(1)	-
Leu	1.8(2)	2.9(3)	2.1(2)	-	-	1.4(1)	1.7(2)	2.2(2)	1.0(1)	2.0(2)
Phe	-	-	0.9(1)	0.7(1)	-	-	-	-	-	-
Lys	0.9(1)	-	0.9(1)	0.8(1)	-	1.0(1)	1.5(2)	2.0(2)	3.7(5)	-
Arg	-	0.7(1)	-	-	0.9(1)	0.65(1)	-	-	-	0.9(1)
Trp	-	-	(1)	-	-	-	-	-	-	-
Summe	(15)	(11)	(15)	(22)	(16)	(6)	(8)	(8)	(26)	(8)

Die unten stehende Abbildung gibt die Positionen der durch Spaltung mit Chymotrypsin entstandenen Peptide auf der Peptidkarte wieder.



struktur von Cpl L12 ergeben.

6. 3. 4. Spaltung mit Chymotrypsin

Die Spaltung von Cpl L12 mit Chymotrypsin lieferte die Peptide C1 - C10. Durch unvollständige Spaltung entstand das Peptid C2''. Das Peptid C7 konnte nicht auf der Dünnschichtplatte identifiziert werden (siehe Tab. 9 mit den Aminosäurezusammensetzungen und dem beistehenden Chromatogramm).

Die durch Hydrolyse bestimmten Aminosäurezusammensetzungen waren in guter Übereinstimmung mit den Werten, die sich aus der Primärstruktur von Cpl L12 ergeben. Die N-terminalen Aminosäuren der Peptide bestätigten die mit Trypsin, Staphylococcus aureus-Protease und Pepsin gewonnen Daten.

6. 4. Enzymatische Spaltungen der großen tryptischen Peptide

Die beiden großen tryptischen Peptide T1 und T3 wurden durch Gelfiltration über Sephadex G 75 isoliert. Die Trennung wurde durch ein Chromatogramm und durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren der Säulenfraktionen verfolgt und verlief wie erwartet, entsprechend dem Molekulargewicht der Peptide. Die frühen Fraktionen enthielten nur Peptid T3 (42 Aminosäurereste), die nächsten enthielten Peptid T1 (24 Aminosäurereste). Es folgten Peptid T10 (15 Aminosäurereste) und alle weiteren Peptide (2-9 Aminosäurereste) in den letzten Fraktionen. Die vereinigten Fraktionen mit Peptid T3 waren frei von Peptid T1, die mit Peptid T1 enthielten weniger als 10% Peptid T10'.

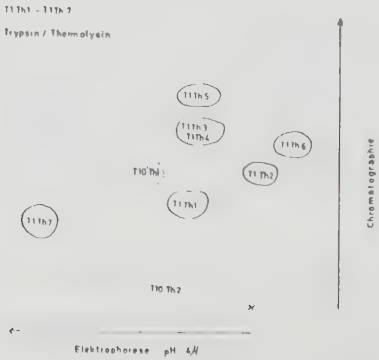
6. 4. 1. Enzymatische Spaltungen von Peptid T1

6. 4. 1. 1. Enzymatische Spaltung von Peptid T1 mit Thermolysin

Tab. 10: Durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzungen der durch Nachspaltung mit Thermolysin entstandenen Peptide von Peptid T1 und T10' von Cpl L12.

Peptid	T1Th1	T1Th2	T1Th3	T1Th4	T1Th5	T1Th6	T1Th7	T10'Th1	T10'Th2
Pos.	1-7	8-10	11-14	15-17	18-19	20-22	23-24	104-107	108-118
N-Term.	Ala	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Val
Asx	-	-	-		-	-	-	-	2.8(3)
Thr	-	-	0.9(1)		1.1(1)	-	-	-	-
Ser	-	-	0.9(1)		-	-	-	-	0.6(1)
Glx	2.0(2)	2.5(2)	1.2(1)		-	2.5(2)	-	1.2(1)	1.3(1)
Pro	0.7(1)	-	-		-	-	-	-	-
Gly	-	-	2.2(2)		-	-	-	1.2(1)	-
Ala	2.1(2)	-	-		-	-	1.0(1)	-	1.9(2)
Val	1.2(1)	-	-		-	-	-	-	0.9(1)
Ile	-	0.9(1)	1.6(2)		-	-	-	-	-
Leu	-	-	-		0.9(1)	0.6(1)	-	0.6(1)	-
Phe	-	-	-		-	-	-	-	-
Lys	1.0(1)	-	-		-	-	-	0.8(1)	2.8(3)
Arg	-	-	-		-	-	1.0(1)	-	-
Summe	(7)	(3)	(4 + 3=7)		(2)	(3)	(2)	(4)	(11)

Die unten stehende Abbildung gibt die Positionen der Peptide von Peptid T1 und T10' auf der Peptidkarte wieder.



Die Spaltung von Peptid T1 mit Thermolysin ergab sieben Peptide T1Th1-T1Th7, deren Chromatogramm und Aminosäurezusammensetzung bei Tabelle 10 zu finden sind. Die Peptide T1Th3 und T1Th4 konnten mit der Fingerprinttechnik nicht getrennt werden und wurden als äquimolares Gemisch sequenziert. Die Aminosäuresequenzen der thermolytischen Peptide bestätigten die mit den oben beschriebenen Peptiden ermittelte Sequenz.Nicht geklärt werden konnte mit diesen Spaltprodukten, ob es sich bei den Aminosäureresten in Position 1o und 14 um Glutamin oder Glutaminsäure handelte, da sich diese Aminosäurereste jeweils in C-terminaler Position befinden.

Die thermolytischen Spaltprodukte von Peptid T1O' waren als schwach gefärbte Flecken sichtbar. Diese beiden Peptide T1O'Th1 und T1O'Th2 wurden durch ihre Aminosäurezusammensetzung und die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren identifiziert.

6. 4. 1. 2. Enzymatische Nachspaltung des Peptids T1 mit Trypsin

Die Nachspaltung des tryptischen Peptids T1 mit Trypsin erfolgte bei einem hohen Enzymsubstratverhältnis. Auch die Salzkonzentration des Puffers wurde erhöht. Unter diesen Bedingungen wurde das Peptid T1 nach Pos. 7 (Lys) fast vollständig gespalten. Peptidkarte und Aminosäurezusammensetzungen der Peptide T1T1 und T1T2 sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Durch die Sequenzierung des Peptids T1T2 konnten die beiden noch nicht bestimmten Aminosäurereste in Peptid T1 eindeutig festgelegt werden.

6. 4. 2. Enzymatische Spaltungen von Peptid T3

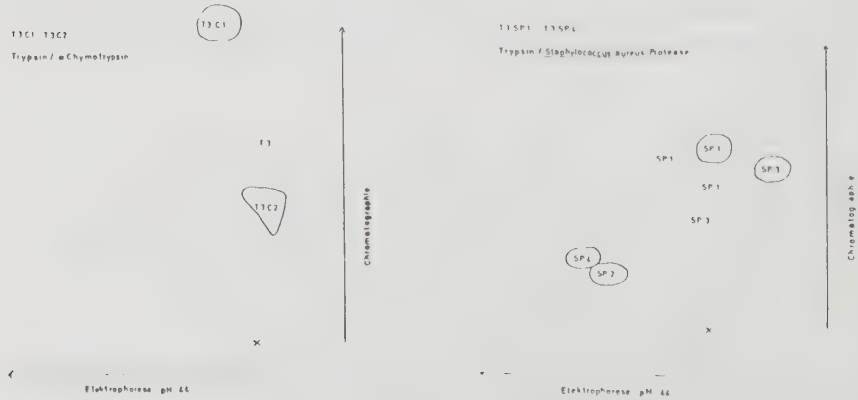
6. 4. 2. 1. Enzymatische Spaltung von Peptid T3 mit Chymotrypsin

Diese Spaltung lieferte zwei Peptide T3C1 und T3C2, deren Chromatogramm und Aminosäurezusammensetzungen in Tabelle 11

Tab. 11: Durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzungen der nach Spaltung mit Chymotrypsin und Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease entstandenen Peptide von Peptid T3 von Cpl L12.

Peptid	T3C1	T3C2	T3SP1	T3SP2	T3SP3	T3SP4
Pos.	34-41	42-75	34-59	60-62	63-69	70-75
N-Term.	Leu	Ala	Leu	Lys	Phe	Val
Asx	-	3.6(4)	1.0(1)	-	2.0(2)	1.0(1)
Thr	-	0.9(1)	-	1.0(1)	-	-
Ser	1.6(2)	1.7(2)	1.8(2)	-	1.0(1)	1.4(1)
Glx	-	4.2(4)	2.3(2)	1.0(1)	1.3(1)	-
Pro	1.3(1)	1.4(1)	4.2(3)	-	-	1.0(1)
Gly	1.3(1)	1.4(1)	2.2(2)	-	-	0.6(0)
Ala	1.7(2)	10.5(10)	11.2(11)	-	-	1.1(1)
Val	1.0(1)	4.0(4)	3.3(3)	-	1.0(1)	0.8(1)
Ile	-	1.0(1)	-	-	-	-
Leu	1.0(1)	-	0.5(1)	-	-	-
Phe	1.0(1)	0.9(1)	0.9(1)	-	0.7(1)	-
Lys	-	1.0(1)	-	0.8(1)	-	-
Arg	-	0.9(1)	-	-	-	0.6(1)
Trp	-	-	-	-	-	-
Summe	(8)	(34)	(26)	(3)	(7)	(6)

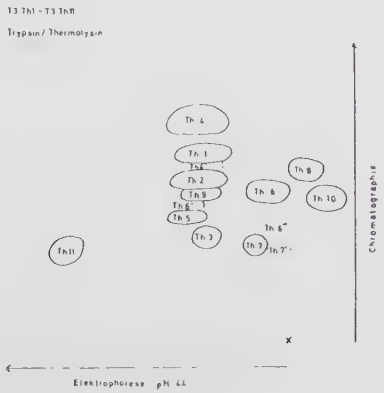
Die unten stehende Abbildung gibt die Positionen der durch Spaltung mit Chymotrypsin und Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease entstandenen Peptide von Peptid T3 auf der Peptidkarte wieder. Der Vollständigkeit halber sind auch die Positionen der Peptide T3SP1', T3SP1'' und T3SP3' angegeben. Sie leiten sich von den Peptiden T3SP1 und T3SP3 ab und sind in nur geringen Mengen entstanden.



Tab. 12: Durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzungen der durch Nachspaltung mit Thermolysin enstandenen Peptide des tryptischen Peptids T3 von Cpl L12.

Peptid	T3Th1	T3Th2	T3Th3	T3Th4	T3Th5	T3Th6	T3Th7	T3Th8	T3Th9	T3Th10	T3Th11
Pos.	34-35	36-38	39-40	41-44	45-46	47-55	56-62	63-64	65-66	67-73	74-75
N-Term.	Leu	Val	Ala	Phe	Ala	Val	Ala	Phe	Val	Ile	Ala
Asx	-	-	-	-	-	1.04(1)	-	1.2(1)	-	2.0(2)	-
Thr	-	-	-	-	-	-	1.1(1)	-	-	-	-
Ser	-	0.8(1)	0.8(1)	-	-	-	-	-	0.9(1)	0.8(1)	-
Glx	-	-	-	-	-	-	3.2(3)	-	-	1.2(1)	-
Pro	-	-	-	1.3(1)	-	2.5(2)	-	-	-	1.1(1)	-
Gly	1.2(1)	-	-	-	-	1.0(1)	-	-	-	-	-
Ala	-	1.1(1)	1.2(1)	1.9(2)	2.0(2)	4.0(4)	0.8(1)	-	-	-	0.9(1)
Val	-	1.1(1)	-	-	-	1.0(1)	1.0(1)	-	1.2(1)	1.1(1)	-
Ile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9(1)	-
Leu	0.8(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	0.8(1)	-	-	-	0.9(1)	-	-	-
Lys	-	-	-	-	-	-	1.0(1)	-	-	-	-
Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0(1)
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	(2)	(3)	(2)	(4)	(2)	(8)	(7)	(2)	(2)	(6)	(2)

Die unten stehende Abbildung gibt die Positionen der durch Nachspaltung mit Thermolysin entstandenen Peptide des tryptischen Peptids T3 auf der Peptidkarte wieder. Im Bereich von T3Th6 und T3Th7 entstanden durch unvollständige Spaltung geringe Mengen weiterer Peptide, deren Position der Vollständigkeit halber wiedergegeben ist.



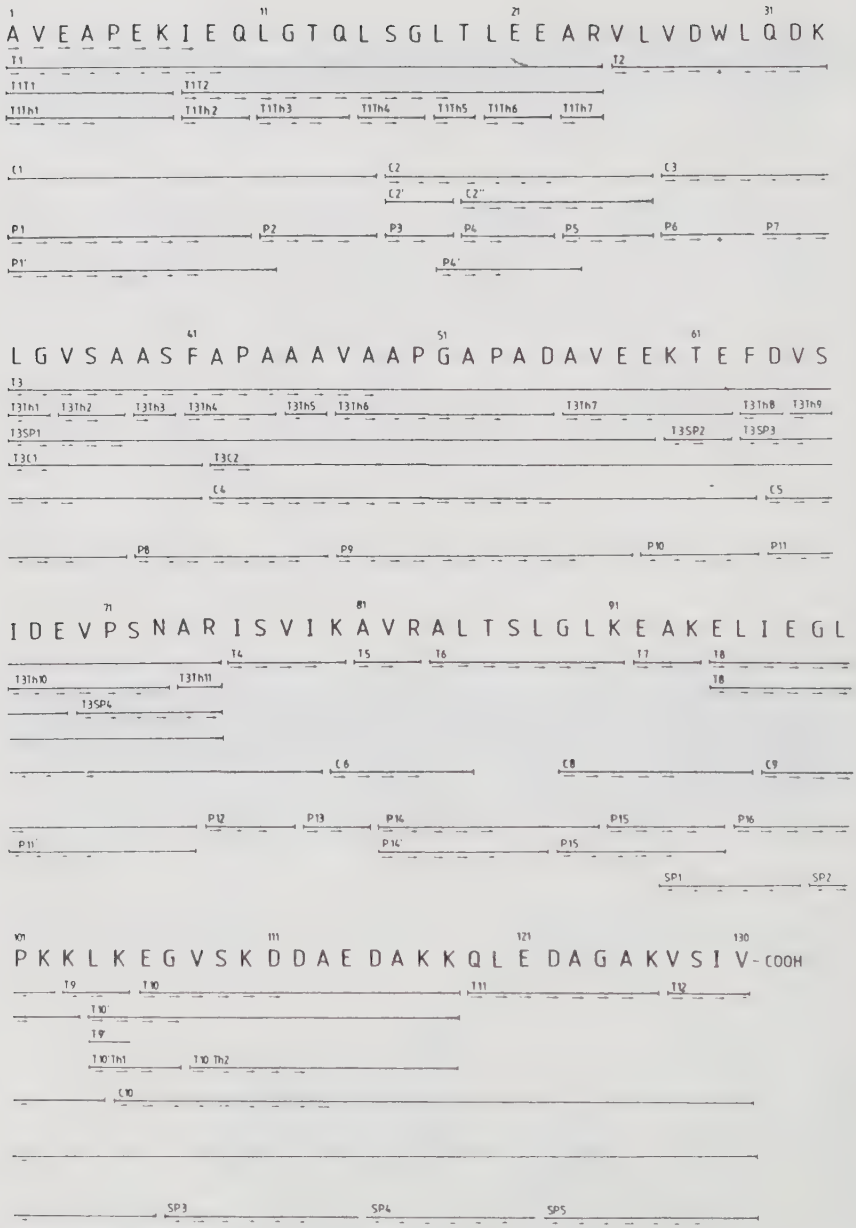


Bild 19: Anordnung der Peptide und vollständige Primärstruktur von Cpl L12. T, C, P und SP bezeichnen Peptide, die durch Verdauung mit Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und Staphylococcus aureus-Protease erhalten werden. TT, TC, TTH und TSP sind enzymatisch gespaltene Peptide der großen tryptischen Peptide (nach Bartsch et al. 1983).

wiedergegeben sind. Die benötigten Informationen über die Aminosäurereste in Position 56-59 und die C-terminalen Aminosäurereste von T3 lieferte diese Spaltung nicht.

6. 4. 2. 2. Enzymatische Spaltung von Peptid T3 mit Thermolysin

Die Spaltung von Peptid T3 mit Thermolysin ergab elf kurze Peptide mit zwei bis neun Aminosäureresten (Tabelle 12). Mit dem Peptid T3Th7 konnte die Reihenfolge der Aminosäuren in Pos. 56-59 bestimmt werden.

6. 4. 2. 3. Enzymatische Spaltung von Peptid T3 mit *Staphylococcus aureus*-Protease

Die Spaltung des Peptids T3 mit *Staphylococcus aureus*-Protease wurde im Alkalischen bei pH 8,1 durchgeführt. nachdem eine Spaltung bei pH 4,4 keine Spaltprodukte lieferte. Sie ergab die Peptide T3SP1-T3SP4 (Tabelle 11). Das Peptid T3SP4 ergab die Aminosäuresequenz des C-Terminus von Peptid T3, insbesondere ein Asparagin in Position 73.

6. 5. Eigenschaften und Vergleich von Cpl L12 mit entsprechenden ribosomalen Proteinen anderer Organismen

Die Konstruktion der Primärstruktur von Cpl L12 aus den sequenzierten Peptiden ist in Bild 19 dargestellt.

6. 5. 1. Charakteristik der Primärstruktur

Cpl L12 besteht aus einer einfachen Polypeptidkette mit 130 Aminosäureresten und hat die Zusammensetzung Asp_9, Asn_1, Thr_4, Ser_9, Glu_{15}, Gln_4, Pro_6, Gly_8, Ala_{22}, Val_{13}, Ile_6, Leu_{14}, Phe_2,

Lys_{13}, Arg_3, Trp_1. Die durch Totalhydrolyse bestimmte Aminosäurezusammensetzung des intakten Proteins ist hiermit in guter Übereinstimmung (Tabelle 5). Am häufigsten ist die Aminosäure Alanin vertreten. Methionin, Tyrosin, Histidin und Cystein fehlen in Cpl L12. Die Aminosäurezusammensetzung ergibt ein Molekulargewicht von 13576.

Modifizierte Aminosäuren, die durch Totalhydrolyse hätten nachgewiesen werden können, wie z.B. methylierte Lysinreste, wurden in Cpl L12 nicht gefunden. Auch der N-terminale Aminosäurerest in Cpl L12 ist nicht modifiziert (Alanin). Im Gegensatz hierzu ist in E. coli eine Methylierung der Proteine S11, L3, L7/12, L11, L16 und L33 bekannt, die N-Termini der Proteine S5, S18 und L7 (acetylierte Form von L12) sind in E. coli acetyliert (Wittmann 1982).

Mit 24 sauren und 16 basischen Aminosäureresten ist Protein Cpl L12 ein saures Protein. Die geladenen Aminosäuren in Cpl L12 sind über die Sequenz ungleich verteilt. Die N-terminale Hälfte enthält zwölf saure und nur vier basische Aminosäurereste und hat damit eine negative Nettoladung, die C-terminale Hälfte dagegen enthält gleich viele (je zwölf) saure wie basische Aminosäurereste. In der sauren N-terminalen Hälfte befinden sich die drei aromatischen Aminosäurereste, ein Tryptophan und zwei Phenylalanine, und die für das ribosomale "A-Protein" charakteristische hydrophobe, alaninreiche Region, in der zehn von zwanzig Aminosäureresten Alaninreste sind. Diese relativ kurze Sequenz von zwanzig Aminosäureresten enthält drei der sechs Prolinreste.

6. 5. 2. Vergleich der Primärstruktur von Cpl L12 mit den ribosomalen "A-Proteinen" aus anderen Organismen

Der Vergleich von Cpl L12 und L12 aus E. coli ist in Bild 20 dargestellt. Die Aminosäurereste von Cpl L12 und L12 aus E. coli können einander so zugeordnet werden, daß sich jeweils ein gemeinsames Tetra-, Penta-, Hexa-, Hepta-, Oktapeptid und ein Peptid mit elf identischen Aminosäureresten ergeben. Insgesamt sind 59 Aminosäurereste in Protein L12 aus Chloroplasten (130 Aminosäurereste) und E. coli (120 Aminosäurereste) iden-

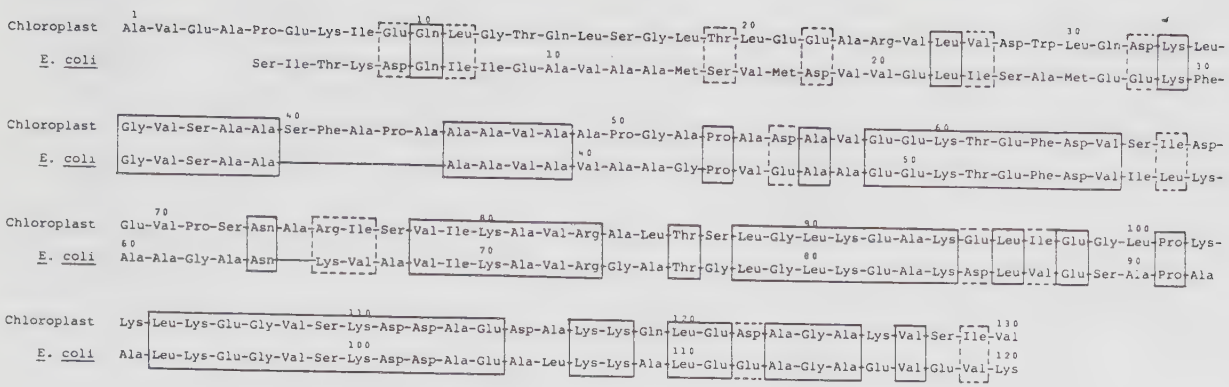


Bild 20: Darstellung identischer und ähnlicher Aminosäurereste in Cpl L12 und E. coli-L12. vollständige Umrandung: identische Aminosäurereste; gestrichelte Umrandung: ähnliche Aminosäurereste.

Tab. 13: Zusammenstellung der bisher vollständig sequenzierten ribosomalen "A-Proteine"

Organismus	Protein	Aminosäurereste	(Ref.)
E. coli	L7/12	120	(1)
NRCC 11227	"A"	122	(2)
Bacillus subtilis	BL9	122	(3)
Micrococcus lysodeicticus	MA1	118	(4)
Micrococcus lysodeicticus	MA3	128	(5)
Streptomyces griseus	"A"	126	(6)
Halobacterium cutirubrum	HL20	112	(7)
Saccharomyces cerevisiae	YP-A1	110	(8)
Artemia salina	eL12	111	(9)
Rattenleber	P2	111	(10)

(1) Terhorst et al. 1973; (2) Falkenberg et al. (nicht publ.); (3) Itoh und Wittmann-Liebold (1978); (4) Itoh 1981; (5) Itoh (nicht publ.); (6) Itoh et al. (1982); (7) Oda et al. (nicht publ.); (8) Itoh 1980; (9) Amons et al. 1979; (10) Lin et al. 1982.

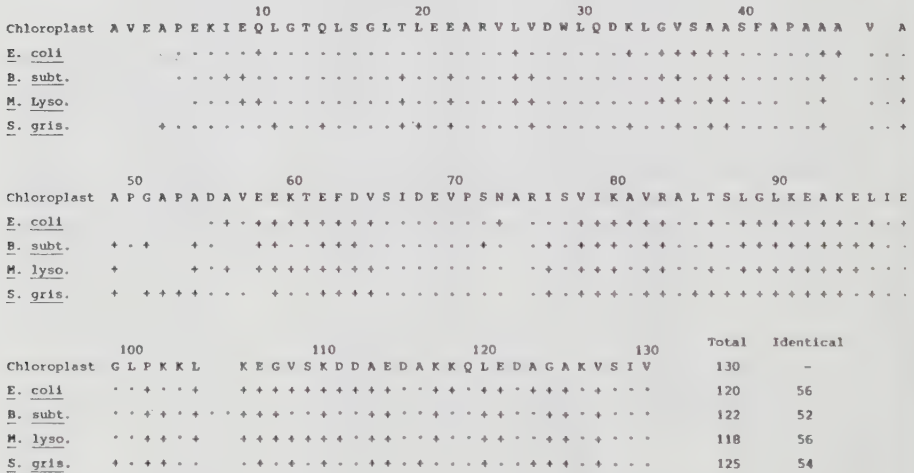


Bild 21: Vergleich der Aminosäurereste verschiedener bakterieller ribosomaler "A-Proteine" mit denen von Cpl L12. (+) identischer Aminosäurerest; (•) nicht identischer Aminosäurerest.

tisch. Weitere vierzehn Aminosäurereste sind durch solche mit sehr ähnlichen physiko-chemischen Eigenschaften ersetzt (Glu/Asp, Lys/Arg, Ile/Leu, Ile/Val, Ser/Thr). Andere, relativ ähnliche Aminosäurereste (Val/Leu, Met/Leu, Phe/Leu, Ala/Val) können durch Austausch einer einzigen Base des kodierenden Tripletts entstanden sein.

Der Vergleich zeigt, daß die ribosomalen "A-Proteine" aus Spinatchloroplasten (Cpl L12) und E. coli (L7/12) offensichtlich phylogenetisch verwandt sind.

Auffällig ist die große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der C-terminalen Hälfte. Hieraus könnte geschlossen werden, daß möglicherweise dieser Bereich bei der Funktion des Moleküls eine wichtige Rolle spielt und keine große Variabilität der Aminosäurereste möglich ist. Im Gegensatz hierzu sind die Aminosäurereste der N-terminalen Region (Pos. 1-32 in Cpl L12) in den verglichenen Proteinen sehr unterschiedlich. In L12 aus E. coli und Chloroplasten sind nur zwei der zweiunddreißig Aminosäurereste der N-terminalen Region identisch. Eine Homologie ist dennoch erkennbar, da außer den identischen einige ähnliche Aminosäurereste in beiden (in gleicher Position) existieren und andere Zuordnungen, z.B. durch Einfügung von Deletionen, die Homologie noch verschlechtern.

Da die Primärstrukturen der L12 entsprechenden eubakteriellen ribosomalen "A-Proteine" auch aus anderen Bakterien (Tab. 13). als E. coli bekannt sind, wurden diese mit Cpl L12 verglichen. Auch hier läßt sich die beim Vergleich mit E. coli beobachtete ungleiche Verteilung identischer Aminosäurereste beobachten. Die Homologie der C-terminalen Hälfte der verglichenen Moleküle ist wesentlich größer als die der N-terminalen Hälfte (Bild 21). Die C-terminale Hälfte von Cpl L12 aus Chloroplasten ist dem Protein L7/12 aus E. coli (gramnegativ) etwas ähnlicher als den entsprechenden Proteinen der Bacillusspezies (grampositiv). In der N-terminalen Hälfte des Moleküls ist dies umgekehrt. Die N-terminale Hälfte des Proteins Cpl L12 gleicht den Proteinen aus Bacilli mehr als dem entsprechenden Protein aus E. coli. Die Region mit den Aminosäureresten 66-76 von Cpl L12 hat mit keinem der bakteriellen Proteine eine Ähnlichkeit, obwohl die letzteren auch in dieser Region einander homolog sind. Die

Summe der identischen Aminosäuren in Cpl L12 und den verschiedenen verglichenen grampositiven und gramnegativen Bakterien ist jeweils fast gleich (52-56, Bild 21). Es kann also keine nähere Verwandtschaft des Proteins Cpl L12 zu entsprechenden Proteinen grampositiver oder gramnegativer Bakterien abgeleitet werden. Im Zusammenhang mit der Evolution von Cpl L12 wäre die Aminosäuresequenz des ribosomalen "A-Proteins" aus den photosynthesetreibenden Bakterien Anacystis nidulans oder Prochloron nicht uninteressant, da Chloroplasten phylogenetisch den Bakterien aus dieser Gruppe zugeordnet werden (siehe Kapitel 2). Bis heute gibt es noch keine Daten über das ribosomale "A-Protein" aus Anacystis nidulans oder Prochloron.

Die Aminosäuresequenz von Cpl L12 wurde mit Hilfe eines Computerprogramms verglichen mit allen 53 ribosomalen Proteinen aus E. coli sowie weiteren bekannten ribosomalen Proteinen anderer Organismen. Mit dem Suchprogramm wurden Peptide in diesen Proteinen gesucht, die mit Cpl L12 fünf oder mehr identische aufeinanderfolgende Aminosäurereste besitzen. Außer in E. coli-L12 und den entsprechenden eubakteriellen ribosomalen "A-Proteinen" wurden Cpl L12 homologe Pentapeptide in E. coli-S1 und den verschiedenen eukaryontischen ribosomalen "A-Proteinen" gefunden (Tabelle 14).

Tab. 14: Identische Pentapeptide , die beim Vergleich von Cpl L12 mit anderen ribosomalen Proteinen gefunden wurden.

Pentapeptid	Pos.	Protein	Pos.	Protein
SLGLK	87-91	Cpl L12	256-260	S1, E. coli
SLGLK	87-91	Cpl L12	343-347	S1, E. coli
APAAA	42-46	Cpl L12	60-64	HL20, H. cutirubrum
APAAA	42-46	Cpl L12	70-74	YP-A1, Bäckerhefe
APAAA	42-46	Cpl L12	88-92	P2, Rattenleber
AAPGA	48-52	Cpl L12	76-80	P2, Rattenleber

Die gemeinsamen Pentapeptide in Cpl L12 und Protein S1 aus E. coli können als zufällig entstanden erklärt werden. So ergab der Vergleich aller 53 ribosomalen Proteine aus E. coli untereinander 35 gemeinsame Pentapeptide und acht Hexapeptide in jeweils zwei verschiedenen Proteinen, obwohl diese sehr wahrscheinlich nicht miteinander verwandt sind. Die möglichen Homologien von Cpl L12 zu den ribosomalen "A-Proteinen" aus Eukaryonten werden in Kapitel 9 diskutiert.

6. 5. 3. Sekundärstruktur und Tertiärstruktur von Cpl L12 und deren Vergleich mit E. coli-L12

Das ribosomale "A-Protein" ist eines der strukturell und funktionell am besten untersuchten Proteine. Auffälliges, gemeinsames Strukturmerkmal der ribosomalen "A-Proteine" ist eine alaninreiche Region in der N-terminalen Hälfte des Moleküls. Funktionsuntersuchungen ergaben, daß die N-terminalen Aminosäurereste an der Bindung von L12 an das Ribosom beteiligt sein könnten (Van Agthoven et al. 1975), während die C-terminale Hälfte eine Rolle bei der Funktion des Moleküls bei der EFG-abhängigen GTP-Hydrolyse spielen soll. Im Hinblick auf eine solche funktionelle Aufteilung ist die beobachtete unterschiedliche Evolution der N-terminalen und C-terminalen Hälfte des Moleküls interessant. Über die mögliche Bedeutung der alaninreichen Region gibt es verschiedene Ansichten. Während Matheson et al.(1980) vorschlugen, daß die alaninreiche Region möglicherweise eine hydrophobe, für die EFG-abhängige GTP-Hydrolyse wichtige Tasche bilden könnte, wies Liljas (1982) darauf hin, daß die alaninreiche Region zwei globuläre Teile des Moleküls räumlich voneinander trennen könnte. Vergleichende Untersuchungen der ribosomalen "A-Proteine" verschiedener Organismen könnten sich für die Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehungen als nützlich erweisen.

Die Sekundärstruktur für Cpl L12, die nach statistischen Methoden von Burgess et al. (1974), Chou und Fassmann (1974,1978), Nagano (1977), Robson und Suzuki (1976) berechnet wurde, und eine Vorhersage, die sich ergibt, wenn mindestens drei der vier

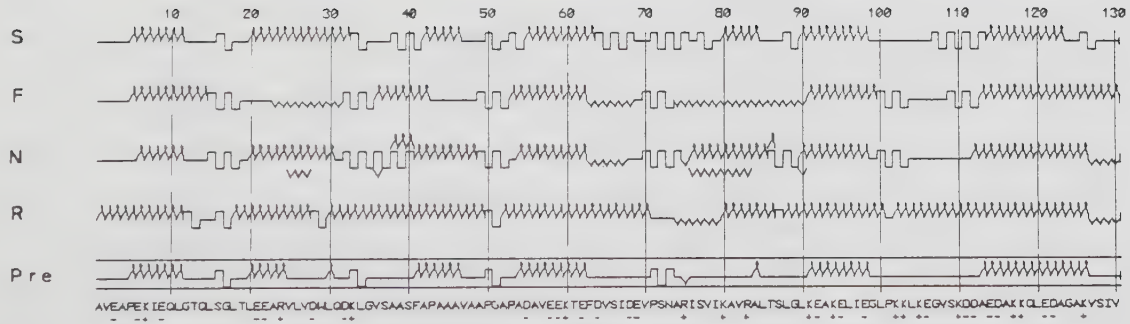


Bild 22: Sekundärstrukturvoraussage für Protein Cpl L12 nach verschiedenen Methoden. (S) nach Burgess et al.(1974); (F) nach Chou und Fassmann (1977,1978); (N) nach Nagano (1977); (R) nach Robson und Suzuki (1976). (Pre) Vorhersage, die sich ergibt, wenn mindestens drei der vier verschiedenen Methoden zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen. : α-Helix; : Haarnadelstruktur (β-Turns); Faltblattstrukturen (β-Sheet).

Methoden zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen, sind in Bild 22 wiedergegeben. Die sich aus übereinstimmenden Berechnungen ergebenden Minimalwerte sind 39,2% für α-Helix, 11,5% für Haarnadelstrukturen (β-Turns). Faltblattstrukturen (β-Sheets) wurden nicht vorhergesagt. Der vorausgesagte Wert für α-Helix ist deutlich niedriger als der Wert für E. coli-L12 (64% α-Helix, Wittmann-Liebold 1980). Leider sind Sekundärstrukturvorhersagen für ribosomale Proteine noch relativ ungenau (Liljas 1982). Die mit dem Programm vorhergesagte α-Helix um das Prolin in Position 43 ist sterisch wahrscheinlich nicht möglich, da Prolin ein sog. "Helixbrecher" ist und nur am Ende einer Helix vorkommen kann.

Größere Bedeutung als den Sekundärstrukturvorhersagen kommt der Kristallisation von Proteinen und Untersuchung der Kristalle mit Röntgenbeugung zu. Ein durch spontane Proteolyse entstandenes C-terminales Fragment von Protein L12 aus E. coli konnte kristallisiert werden und wurde mit Röntgenbeugung untersucht (Leijonmarck und Liljas 1982). Die Analyse der Daten ergab, daß das C-terminale Fragment von Protein L12 aus E. coli aus drei α-Helices und drei antiparallelen Faltblattstrukturen (β-Sheets) besteht. Dieser globuläre Teil ist durch die alaninreiche Region mit dem N-Terminus des Proteins verbunden. Aus der durch Röntgenbeugung bestimmten Tertiärstruktur des C-terminalen Fragments von E. coli-L12 können die Koordinaten einzelner Aminosäurereste in einem dreidimensionalen Modell bestimmt werden. Von Liljas et al. (nicht publiziert) wurde mit einem Computerprogramm untersucht, ob die Aminosäurereste von Cpl L12 ähnliche Koordinaten einnehmen können. Dieses ist trotz der unterschiedlichen Aminosäurereste recht gut möglich. Eine vorgeschlagene Bindungsstelle für ein Sulfat-Ion, die sich in allen untersuchten bakteriellen ribosomalen "A-Proteinen" ergeben kann, und die deshalb möglicherweise funktionell wichtig sein könnte, wäre auch in Cpl L12 möglich. Die Anionenbindungsstelle in Cpl L12 wäre gegenüber der in E. coli um ca. 1Å verschoben und würde teilweise durch Aminosäurereste vermittelt, die sich in Cpl L12 und E. coli L12 in nicht entsprechenden Positionen befinden.

6. 6. Kritik der angewendeten Methoden

Die Aufreinigung und Sequenzierung von Cpl L12 gestaltete sich nach Isolierung einer ausreichenden Menge Chloroplastenribosomen als relativ unproblematisch. Das zur Ionenaustauschchromatographie verwendete Säulenmaterial DEAE-Cellulose erwies sich in Verbindung mit der Anwendung eines Salzgradienten zur Elution als gut geeignet für die Aufreinigung dieses sauren Proteins.

Die Aminosäurezusammensetzung und vor allem der geringe Anteil oder das Fehlen schwer zu bestimmender Aminosäuren wie Tryptophan, Cystein und Histidin erleichterten die Aufgabe, die Primärstruktur dieses Proteins zu ermitteln. Erschwert wurde dies allerdings dadurch, daß bei dem wenigen zur Verfügung stehenden Material viele Peptide nur eine begrenzte Anzahl von Schritten abgebaut werden konnten. Die Sequenz mußte daher zum Teil aus relativ kurzen, unvollständig sequenzierten Teilstücken der Peptide verschiedener Verdauungen konstruiert werden.

Fast die Hälfte des zur Verfügung stehenden Materials wurde für Verdauungen mit Trypsin eingesetzt. Die meisten der durch tryptische Spaltung erzeugten Peptide waren wegen der relativ geringen Anzahl ihrer Aminosäurereste gut zur Sequenzierung geeignet und konnten ausreichend auf den Dünnschichtplatten durch Fingerprinttechnik getrennt werden. Die Trennung einiger negativ geladener Peptide (z.B. T1, T2, T3 und T8) könnte wahrscheinlich noch verbessert werden, wenn bei der Elektrophorese ein Puffer mit neutralem pH-Wert verwendet wird.

Schwierig war die Sequenzierung der hydrophoben C-terminalen Aminosäuren (Peptid T12), da diese bei der Extraktion des überschüssigen Reagenz' in die organische Phase verloren gingen. Hier erwies sich die manuelle Festphasensequenzierung den üblichen Methoden gegenüber als überlegen. Als schwierig gestaltete sich auch die Bestimmung der Aminosäurereste der großen Peptide T1 und T3, da in deren Region auch mit den anderen enzymatischen Spaltungen des intakten Proteins keine günstig gelegenen Schnittstellen erhalten wurden. Möglicherweise wäre es günstiger gewesen, die tryptische Verdauung des intakten Pro-

teins unter Bedingungen, wie sie bei der Nachspaltung des isolierten Peptids T1 angewendet wurden, durchzuführen, da unter diesen Bedingungen eine Peptidbindung mit Lysin in T1 mit Trypsin gespalten wird. Die gegen proteolytische Verdauung recht resistente alaninreiche Region von Cpl L12 hätte allerdings zumindest die Isolierung des Peptids T3 erfordert.

Die Anwendung der Enzyme Clostripain (spezifische Spaltung nach Arginin) und Armillaria mellea-Protease(spezifische Spaltung vor Lysin) erwies sich als nicht sinnvoll, da die zu erwartenden Ergebnisse nicht die der anderen Enzyme ergänzt hätten.

Für die Trennung und Sequenzierung der Peptide von Cpl L12 waren die in Anwendung gekommenen Methoden, die heute bereits zum Teil durch effektivere Methoden wie die HPLC-Technik oder automatische Aminosäure-Sequenatoren ersetzt werden können, durchaus ausreichend.

7. Isolierung weiterer ribosomaler Proteine aus Spinatchloroplasten

Bei der Extraktion von Cpl L12 mit der Methode nach Hamel et al.(1972) entstanden außer der Fraktion mit Cpl L12 zwei weitere Fraktionen mit ribosomalen Proteinen. Die eine Fraktion enthielt die nach der Extraktion verbliebenen ribosomalen 70S-Corepartikel (Fraktion 3), die andere enthielt einige extrahierte basische Proteine, die nach der Evaporation von Äthanol präzipitiert waren, in Harnstoff jedoch gelöst werden konnten.

7. 1. Trennung ribosomaler Proteine aus Fraktion 3

Die mit Essigsäure extrahierten Proteine der ribosomalen Corepartikel wurden durch Gelfiltration über Sephadex G 100 Superfine fraktioniert. Bild 23 zeigt das erhaltene UV-Absorptionsprofil, Bild 24 die Analyse der Fraktionen durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch die Gelfiltration wurde eine gute Trennung der sauren und relativ hochmolekularen Proteine (> 20000 Dalton) erreicht, die Trennung der Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen zehn- und zwanzigtausend Dalton war wesentlich schlechter. Sehr wahrscheinlich sind bei der hohen Proteinkonzentration (60 mg/ml) zwischen den basischen Proteinen untereinander oder auch zwischen den Proteinen und dem Säulenmaterial trotz des sauren Fließmittels (5% Essigsäure in 6 M Harnstoff) Wechselwirkungen aufgetreten, die die Trenneigenschaften der Sephadex-Säule verschlechtert haben.

Die frühen Fraktionen der Gelfiltration enthalten nur wenige Proteine. Eine Möglichkeit, diese Proteine weiter aufzutrennen, ist die präparative Elektrophorese auf Celluloseacetatgelen. So

konnten die Proteine aus Fraktion 69 (u.a. Cpl L1, siehe Kapitel 8) ausreichend gut getrennt und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet werden. Für die späteren Fraktionen (insbesondere Fraktion 110-150) müßten jedoch sehr leistungsfähige Trenntechniken angewendet werden, da diese Fraktionen bis zu 40 verschiedene Proteine enthalten. Alle Fraktionen wurden eingefroren, um das Material (ca. 1,5 g Protein) im Rahmen späterer Untersuchungen zu verwenden.

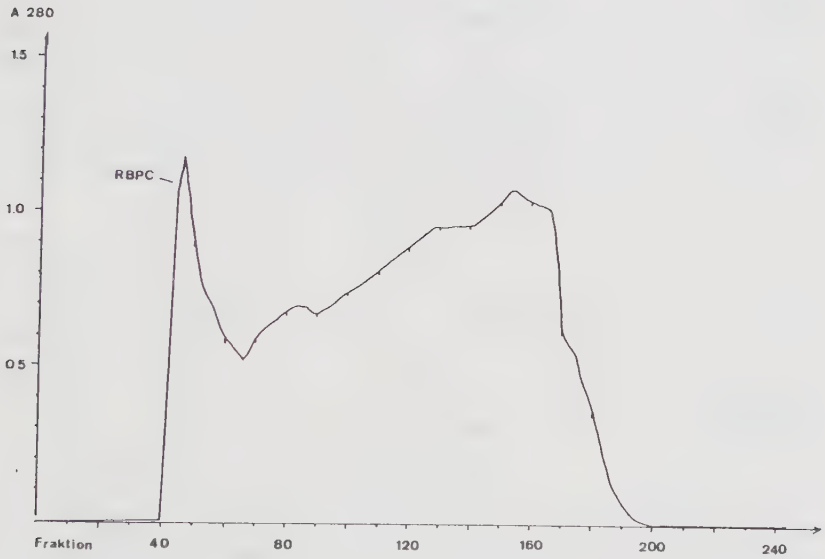


Bild 23: UV-Absorptionsprofil. Trennverlauf der Gelfiltration ribosomaler Proteine über Sephadex G 100 Superfine. RBPC = Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase. (Experimentelle Einzelheiten siehe Kapitel 3).

Bild 24: Elektropherogramme. Analyse der durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen ribosomaler Proteine auf zweidimensionalen Polyacrylamidgelen (nach Geyl et al. 1981).

7. 2. Isolierung und Charakterisierung der Proteine aus Fraktion 2

Bei der Isolierung von Cpl L12 waren nach Entfernung des Äthanols durch rotierende Evaporation einige extrahierte basische Proteine präzipitiert. Als besonders geeignet zur Isolation erschien das Protein b1, da es aufgrund seiner elektrophoretischen Mobilität bei der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese eindeutig der 30S-Untereinheit zugordnet werden konnte. Für die Isolierung von Protein b1 wurde zunächst eine Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose (CM 52) durchgeführt. Da die Ionenaustauschchromatographie keine ausreichende Trennung des Proteins b1 ergab, erfolgte eine weitere Aufreinigung durch HPLC ("high pressure liquid chromatography") an einer RPP-Säule. Experimentelle Einzelheiten hierzu sind in Kapitel 3 beschrieben. Bild 25 zeigt das UV-Absorptionsprofil, das bei der Ionenaustauschchromatographie erhalten wurde.

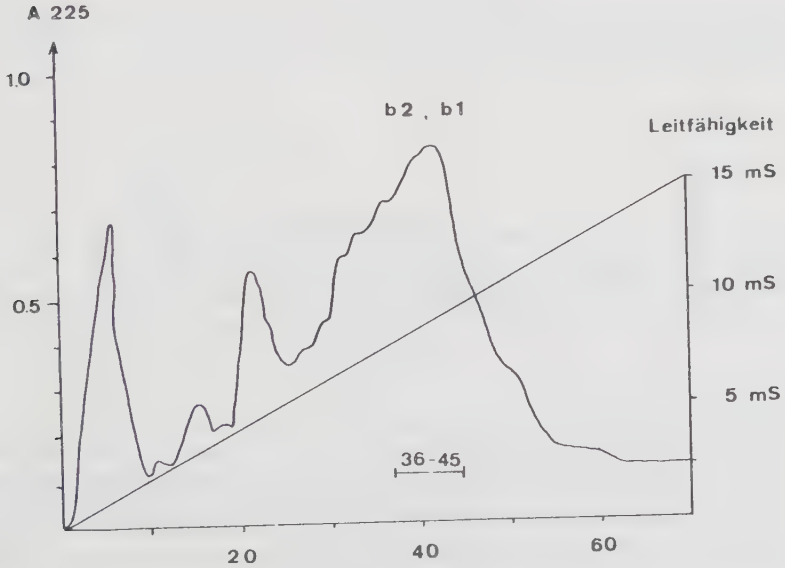


Bild 25: UV-Absorptionsprofil. Isolierung des Proteins b1 und eines weiteren Proteins b2 durch Kationenaustauschchromatographie. Die bei der Elution erhaltenen Fraktionen 36-45 wurden durch HPLC weiter aufgetrennt.

Der Trennverlauf der nachfolgenden HPLC ist in Bild 26 und 27 dargestellt.

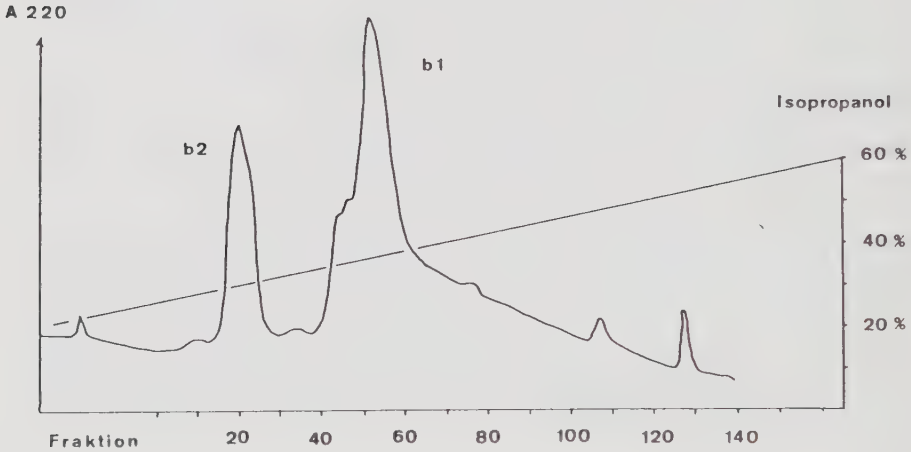


Bild 26: UV-Absorptionsprofil. Trennung der durch Kationenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen mit Protein b1 und b2 durch HPLC an einer RPP-Säule. Experimentelle Einzelheiten siehe Kapitel 3.

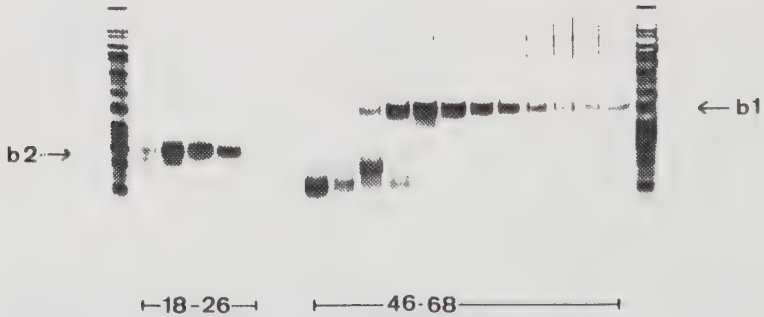


Bild 27: Elektropherogramm. Analyse der bei der HPLC-Trennung entstandenen Fraktionen 18-26 und 46-68. In Fraktion 22 ist Protein b2 rein dargestellt, in Fraktion 56 Protein b1. Außen: 20 g TP30 aus Spinatchloroplastenribosomen.

Die Koelektrophorese der isolierten Proteine mit Proteinen aus 70S-Chloroplastenribosomen ist in Bild 28 dargestellt.

Bild 28: Elektropherogramm. 2D-Elektropherese nach Geyl et al. (1981) zur Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität von Protein b 1 und b2. (A) Protein b1 mit 50 μg TP70 aus Spinatchloroplastenribosomen als Hintergrund. (B) Protein b2 mit 50 μg TP70 aus Spinatchloroplastenribosomen als Hintergrund. (C) 50 μg TP70 aus Spinatchloroplastenribosomen.

In Tabelle 15 sind die durch Totalhydrolyse bestimmten Aminosäurezusammensetzungen von Protein b1 und b2 zusammengestellt. Wegen des hohen Wertes für Phenylalanin ist die Aminosäurezusammensetzung von Protein b2 für ein ribosomales Protein untypisch. Die durch manuellen Mikro-Edman-Abbau bestimmten ersten sechs Aminosäurereste des N-terminalen Bereichs des Proteins b2 sind in Bild 29 wiedergegeben.

Tab. 15: Aminosäurezusammensetzungen der Proteine b1 und b2 aus Spinatchloroplastenribosomen (in Mol%).

	Protein b2	Protein b1
Asx[a]	13.6	6.9
Thr	1.4	5.3
Ser	2.8	5.0
Glx[a]	16.0	9.6
Pro	3.0	3.1
Gly	7.0	6.4
Ala	5.6	9.5
Val	5.2	6.6
Met	2.3	1.9
Ile	1.1	6.2
Leu	3.4	9.0
Tyr	2.4	2.3
Phe	6.9	2.7
His[b]	1.0	2.3
Lys[b]	11.0	11.2
Arg[b]	16.0	11.6
$\frac{b}{a}$	0.94	1.52
Molekulargewicht	ca.11 K	ca.19 K

Protein b2 NH_2-Phe-Arg-Ser-Ala-Tyr-Asn-

Protein b1 NH_2-Pro-Arg-Arg-Gly-Thr-Val-Glu-

E. coli- S7 NH_2-Pro-Arg-Arg-Arg-Val-Ile-Gly-

B. subt.-S7 NH_2-Pro-Arg-Lys-Gly-Pro-Val-Ala-

Bild 29: N-terminale Aminosäuresequenz der Proteine b2 und b1 aus Spinatchloroplastenribosomen. Vergleich der N-terminalen Aminosäuren von Protein b1 mit denen von Protein S7 aus E. coli und Bacillus subtilis.

Es war anhand der elektrophoretischen Mobilität dieses Proteins in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen nicht möglich, b2 eindeutig einer der beiden ribosomalen Untereinheiten zuzuordnen.

Die durch manuellen Mikro-Edman-Abbau bestimmte N-terminale Aminosäuresequenz von Protein b1 ergibt eine Homologie zu den N-terminalen Aminosäuren von Protein S7 aus E. coli und Bacillus subtilis (Bild 29). Aus der elektrophoretischen Mobilität in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen (siehe Bild 10, 12, 15) ergibt sich, daß Protein b1 wie Protein S7 aus E. coli ein Bestandteil der ribosomalen 30S-Untereinheit ist. Auch Molekulargewicht (ca. 19000) und Ladung dieser Proteine stimmen in etwa überein. Ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich bei Protein b1 und S7 um einander entsprechende Proteine handelt, ist die in Kapitel 8 beschriebene Kreuzreaktion mit Anti-E. coli-S7. In Kapitel 8 wurde Protein b1 deshalb Cpl S7 genannt.

In E. coli bindet Protein S7 in der Nähe des 3'-Terminus an die 16S-RNS und kann erst mit hohen Salzkonzentrationen von Ribosomen extrahiert werden. Weshalb das Protein b1 zumindest teilweise bereits mit der relativ geringen Salzkonzentration (1 M), wie sie bei der Extraktion nach Hamel et al. (1972) verwendet wird, extrahiert wurde, ist schwer zu erklären. Vielleicht wurde die Extraktion von Protein b1 durch Äthanol begünstigt.

8. Immunologische Untersuchungen an Proteinen der Chloroplastenribosomen

Mit immunologischen Methoden können Aussagen über die Eigenschaften ribosomaler Proteine gemacht werden, bevor Daten über die Primärstrukturen derselben bekannt sind. Die 52 ribosomalen Proteine aus E. coli sind immunologisch verschieden und besitzen keine gemeinsamen antigenen Determinanten (Stöffler 1974, Stöffler und Wittmann 1977). In phylogenetischen Untersuchungen konnte die Existenz von Kreuzreaktionen ribosomaler Proteine auch in relativ entfernt verwandten Organismen (wie z.B. zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien) und damit die Existenz einander entsprechender Proteine in diesen Organismen nachgewiesen werden. Hierzu wurden Methoden, die auf der Bildung von präzipitierenden Immunkomplexen beruhen, verwendet (Geisser et al. 1973). In so verschiedenen Ribosomen wie den 70S-Ribosomen aus E. coli und den 80S-Ribosomen aus Eukaryonten konnten, abgesehen von Protein L7/12, mit den klassischen immunologischen Methoden keine nachweisbaren Homologien festgestellt werden. Auch mit den bisher verfügbaren Daten über die Primärstrukturen konnten die ribosomalen Proteine der Eukaryonten nicht denen der Eubakterien zugeordnet werden (siehe Kapitel 1).

Für die Untersuchung der antigenen Eigenschaften der Proteine aus Chloroplastenribosomen standen Seren zur Verfügung, die gegen Ribosomen, Untereinheiten, deren Totalprotein oder gegen einzelne ribosomale Proteine aus E. coli entwickelt waren (Anti-70S, Anti-50S, Anti-30S, Anti-TP70, Anti-TP50, Anti-TP30 und Anti-S1 bis Anti-L34). Außerdem wurde mit Seren gegen Spinatchloroplastenribosomen (Anti-70S) gearbeitet.

8. 1. Immundoppeldiffusion in Agarosegelen und Immunpräzipitation auf Celluloseacetatgelen

Die Austestung der Antiseren gegen einzelne ribosomale Proteine der 50S-Untereinheit aus E. coli (Anti-E. coli-L1 bis L34) mittels Immundoppeldiffusion ergab außer für Protein L7/12 (siehe Kapitel 5) keine weiteren eindeutigen Kreuzreaktionen. (Immerhin ergaben Anti-L1 und Anti-L6 sehr schwache Präzipitationslinien, die auf eine fragliche Kreuzreaktion schließen ließen.) Auch mittels Immunelektrophorese auf Celluloseacetatgelen konnten keine heterologen Immunpräzipitate nachgewiesen werden, die von unspezifischen Reaktionen unterschieden werden konnten (Bild 30).

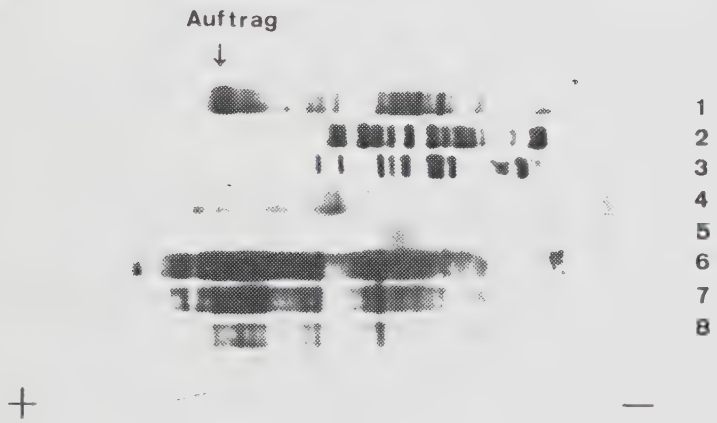


Bild 30: Elektropherogramm. Immunelektrophorese ribosomaler Proteine aus Spinatchloroplasten und E. coli, Inkubation mit einem Antiserum gegen Spinat-70S-Ribosomen (R27-Anti-Spinat-70S). Auftrag: (1) 75 µg Spinat-TP70; (2) 50 µg E. coli-TP50; (3) 25 µg E. coli-TP30; (4) 50 µg E. coli-TP50; (5) 25 µg E. coli-TP30; (6) 100 µg Spinat-TP70; (7) 50 µg Spinat-TP70; (8) 25 µg Spinat-TP70. (1)-(3) direkte Färbung der Proteine mit Coumassieblau; (4)-(8) Färbung der Immunkomplexe nach Inkubation mit dem Antiserum. Viele Spinatproteine reagierten unterschiedlich stark mit dem Antiserum. Mit E. coli-Proteinen ließen sich dagegen keine heterologen Immunpräzipitate nachweisen, die von unspezifischen Reaktionen unterschieden werden konnten.

8. 2. Immunreaktionen auf Nitrocellulosepapier

8. 2. 1. Empfindlichkeit, Spezifität und notwendige Kontrollen

Da die Doppeldiffusion in Agarosegelen und die Immunelektrophorese auf Celluloseacetatgelen keine eindeutigen Ergebnisse brachten, wurde eine relativ neue, hochempfindliche Methode angewandt,die als "Immunoblotting" bezeichnet wird. Bei dieser Methode werden die Antigene elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf Nitrocellulosepapier übertragen und fixiert. Die Antigen-Antikörper-Reaktionen erfolgen an diesen auf Nitrocellulosepapier immobilisierten Antigenen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch fluorescein- oder peroxydasekonjugierte Anti-Antikörper nachgewiesen (Doppelantikörpermethode, Towbin et al. 1979). Mit dieser Methode können, wie bei der direkten Untersuchung durch Elektronenmikroskopie oder im Radioimmunoassay, auch nicht-präzipitierende Antikörper nachgewiesen werden. Immunoblotting ermöglicht außer dem hochempfindlichen Nachweis von Antigenen auch, die Antigene elektrophoretisch zu charakterisieren.

Der Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen mit konjugierten Antikörpern ist extrem empfindlich. Mit peroxydasekonjugierten Antikörpern können je nach Titer des verwendeten ersten Antikörpers weniger als ein ng Antigen nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von fluoresceinkonjugierten Antikörpern ist die Grenzempfindlichkeit etwas geringer, bei der Verwendung von ^{131}J-markierten Antikörpern noch wesentlich höher. Begrenzt wird diese Empfindlichkeit allerdings durch mögliche unspezifische Reaktionen, deren Auftreten in hohem Maße davon abhängt, welche Eigenschaften die untersuchten Proteine haben. Da in einigen neueren Publikationen deshalb Inkubationspuffer angegeben wurden, die verschiedene Detergenzien enthalten, wurde der Einfluß dieser Detergenzien auf spezifische und unspezifische Reaktionen untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 16 zusammengefaßt. Hieraus ergibt sich, daß Detergenzien bei Proteinen wie Myoglobin, Cytochrom C, Hämerythrin und Serumproteinen zur Unterdrückung unspezifischer Reaktionen nicht notwendig sind, daß aber

basische Proteine wie ribosomale Proteine oder Histone unspezifisch mit IgG reagieren können. Diese Reaktion kann durch ionische Detergenzien(SDS oder N-Lauroylsarcosin) unterdrückt werden. Zur Unterdrückung einer unspezifischen Reaktion mit dem relativ hydrophoben ribosomalen Protein L12 (E. coli) ist dagegen ein nicht-ionisches Detergenz (Triton X 100) notwendig. Besonders effektiv ist die Kombination der Detergezien SDS und Triton X 100 (Puffer 1, siehe Kapitel 3). Da SDS zur vollständigen und irreversiblen Hemmung der Peroxydaseaktivität führt, wurde bei allen Inkubationen mit peroxydasekonjugierten Antikörpern anstelle von SDS N-Lauroylsarcosin verwendet (Puffer 2, siehe Kapitel 3).

Tab. 16: Einfluß verschiedener Puffer und Detergenzien auf spezifische und nicht-spezifische Reaktionen verschiedener Proteine mit Anti-Hammel-Serum.

	NaCl			Triton X 100		SDS		N-Lauroyl-sarcosin		Triton/SDS
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ribosomale Proteine (Spinatchloroplasten TP70)	++	++	++	++	++	+	-	+	-	-
Histon IV	++	++	++	++	++	+	-	+	-	-
L12 (E. coli)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Myoglobulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytochrom C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hämerythrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Non-Immunserum (Kaninchen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Non-Immunserum (Hammel)	10+	10+	10+	10+	10+	8+	5+	10+	10+	5+

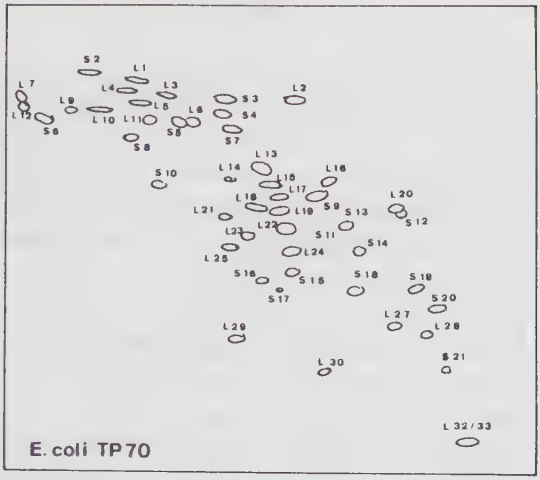
Jeweils 1 μg der angegebenen Proteine wurde auf Streifen aus Nitrocellulosepapier pipettiert. Nach Absättigung mit 1% BSA wurden die Streifen mit fluoresceinkonjugiertem Anti-Hammel-IgG (aus Kaninchen) in den folgenden Puffern inkubiert: (1) PBS; (2) PBS/0,5 M NaCl; (3) PBS/1 M NaCl; (4) PBS/0,25% Triton X 100; (5) PBS/0,5% Triton X 100; (6) PBS/0,1% SDS; (7) PBS/0,2% SDS; (8) PBS/0,1 % N-Lauroylsarcosin; (9) PBS/0,2% N-Lauroylsarcosin; (10) PBS/0,5% Triton X 100/0,2% SDS. Die in (10) angegebene Kombination eines ionischen und eines nicht-ionischen Detergenz' ergab bei keinem der getesteten Proteine eine unspezifische Reaktion. (+), (++), (5+), (8+) und (10+) stehen für verschieden starke Fluoreszenz, (-) keine sichtbare Fluoreszenz unter UV-Licht.

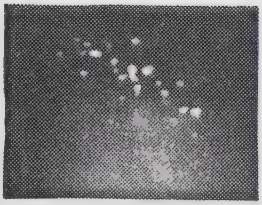
Neben diesen unspezifischen, durch Anwendung von Detergenzien unterdrückbaren Reaktionen können auch geringe bekannte Verunreinigungen in den Antiseren, die bei den üblichen immunologischen Methoden nicht stören, wegen der hohen Empfindlichkeit bei der Doppelantikörpermethode zu falsch positiven Ergebnissen führen. Da durch Immunoblotting darüber hinaus auch Verunreinigungen in Antiseren nachgewiesen werden können, die mit den üblichen immunologischen Methoden unentdeckt bleiben, wurden für Kontrollexperimente nicht nur Non- oder Präimmunseren verwendet, sondern das jeweils mit dem entsprechenden Antigen abgesättigte Serum.

In Bild 31 ist das Ergebnis eines Vorversuchs (Inkubation ohne Detergenzien) dargestellt. Zweidimensional aufgetrennte ribosomale Proteine aus E. coli wurden auf Nitrocellulosepapier übertragen und mit zwei verschiedenen Antiseren (Kaninchen) gegen ribosomale Proteine aus Spinatchloroplasten inkubiert. Der Nachweis von Immunkomplexen erfolgte mit fluoresceinkonjugierten Antikörpern (Anti-Kaninchen-IgG, Hammel). Die verschiedenen heterologen Immunkomplexe zeigen eine unterschiedlich starke Fluoreszenz. Mit dem einen Serum reagieren viele Proteine aus E. coli (S5, S7, S9, S14, S19, L2, L6, L17, L18, L24) relativ stark, während mit dem anderen Serum nur die Proteine S7, S19, S5/L6 und L11 Immunkomplexe bilden. Die zur Kontrolle durchgeführte Inkubation mit dem Serum eines nicht immunisierten Tieres (Nonimmunserum) ergab eine nur sehr schwache Fluoreszenz einiger Proteine.

8. 2. 2. Vorgehensweise zur Demonstration von Kreuzreaktionen zwischen ribosomalen Proteinen aus Chloroplasten und E. coli

Um die in dem Vorversuch beobachteten Kreuzreaktionen zu bestätigen und um die homologen Proteine aus Chloroplastenribosomen und E. coli-Ribosomen zu korrelieren, wurden Seren gegen einzelne ribosomale Proteine aus E. coli verwendet. Um das Auftreten der oben gezeigten unspezifischen Reaktionen a priori zu verhindern, wurde die Inkubation aller nachfolgend beschriebenen Versuche mit Detergenzien durchgeführt. Für jedes Serum wurde





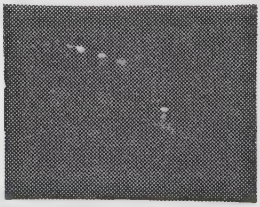


Bild 31: Nachweis von Kreuzreaktionen ribosomaler Proteine aus E. coli mit Antiseren gegen Spinatchloroplastenribosomen (Vorversuch). Die Proteine wurden auf zweidimensionalen Polyacrylamidgelen nach Geyl et al. aufgetrennt, auf Nitrocellulosepapier übertragen und mit verschiedenen Antiseren gegen Spinatchloroplastenribosomen inkubiert. Der Nachweis der Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte durch fluoresceinkonjugierte Anti-Antikörper unter UV-Licht. (A)und (B) Nach dem Transfer mit Coumassieblau gefärbte Polyacrylamidgele. Die Positionen der Proteine sehen aus wie ausgestanzt. (C) und (D) mit zwei verschiedenen Antiseren gegen Spinatchloroplastenribosomen inkubierte Nitrocellulosereplikate der oben dargestellten Gele. In (C) kann eine starke Fluorescenz der Proteine S5, S7, S9, S14,S19, L2, L6, L17, L18 und L24 nachgewiesen werden, in (D) die Fluorescenz der Proteine S7, S19, S5/L6 und L11. Außerdem sind in (D) einige Artefakte sichtbar. Die Antikörperinkubationen erfolgten ohne Detergentien.

eine Absättigungskontrolle mit dem entsprechenden reinen Antigen durchgeführt.

Für die Versuche mit den Antikörpern gegen einzelne ribosomale Proteine wurden diese (aus Chloroplasten und E. coli) zunächst eindimensional auf SDS-Polyacrylamidgelen getrennt und auf Nitrocellulosepapier übertragen. Mit schmalen Teststreifen wurden die Seren, die eine Kreuzreaktion ergaben, festgestellt. Danach erfolgten die Absättigungsexperimente. Das Molekulargewicht der kreuzreagierenden ribosomalen Proteine aus E. coli und Spinatchloroplasten wurde durch Koelektrophorese in einem Gel verglichen. Zur Demonstration einiger Kreuzreaktionen wurden die Proteine auch auf Celluloseacetatgelen elektrophoretisch getrennt. Zur endgültigen Identifikation wurden die Proteine in Polyacrylamidgelen zweidimensional aufgetrennt. Die auf Nitrocellulosepapier übertragenen Proteine wurden vor der Immunreaktion mit Toluidinblau gefärbt, mit Bleistift markiert und entfärbt. Wegen der größeren Empfindlichkeit wurde in den meisten Experimenten mit peroxydasekonjugierten Antikörpern gearbeitet. Experimentelle Einzelheiten sind in Kapitel 3 beschrieben.

8. 3. Ergebnisse und Diskussion

In Bild 32 und 33 sind die Ergebnisse für die Proteine L1 und L2 exemplarisch zusammengestellt. Das Serum gegen das ribosomale Protein L2 aus E. coli reagiert mit einem Protein aus Spinatchloroplasten. Aus der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ergibt sich wegen der identischen Mobilität des kreuzreagierenden Proteins aus Chloroplastenribosomen und E. coli-L2, daß beide Proteine ein sehr ähnliches Molekulargewicht haben (Bild 32 A, links). Die Reaktion mit dem Antiserum ist spezifisch und wird durch Absättigung des Serums mit L2 vor der Inkubation unterdrückt (Bild 32 A, rechts). Die Celluloseacetatgelelektrophorese, bei der kein Molekularsiebeffekt auftritt und die Proteine vorwiegend aufgrund ihrer Nettoladungen aufgetrennt werden, zeigt, daß E. coli-L2 und das kreuzreagierende Protein aus Chloroplasten sehr basische Proteine sind. Die Mobilität auf Cellulose-

acetatgelen ist bei der Kurzelektrophorese fast identisch (Bild 32 B). Ebenso ist die Mobilität der beiden Proteine bei der 2D-Elektrophorese sehr ähnlich (Bild 32 C und D). Die Kreuzreaktion konnte sowohl mit fluorescein- als auch mit peroxidase-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden.

Wie die Koelektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel zeigt, ist das mit Protein L1 aus E. coli kreuzreagierende Protein aus Chloroplastenribosomen etwas größer (Molekulargewicht ca. 30K) als Protein L1 aus E. coli (Molekulargewicht ca. 24,6 K) (Bild 33 A, links). Die Reaktion des Serums mit dem Chloroplastenprotein ist spezifisch und läßt sich ebenso wie die Reaktion mit E. coli-L1 durch Absättigen unterdrücken (Bild 33 A, rechts). Aus der Mobilität bei der Celluloseacetatgelelektrophorese ergibt sich, daß das mit L1 kreuzreagierende Protein aus Chloroplasten etwas saurer als E. coli-L1 ist (Bild 33 B). Dieses ist auch aus der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese ersichtlich. Die elektrophoretische Mobilität des mit E. coli-L1 kreuzreagierenden Chloroplastenproteins ist sowohl in der ersten Dimension (Trennung hauptsächlich nach Ladung) als auch in der zweiten (Trennung hauptsächlich nach Molekulargewicht) etwas geringer als die von E. coli-L1.

In Tabelle 17 sind alle weiteren durchgeführten Experimente zusammengefaßt. In den Bildern 34 und 35 sind die nach zweidimensionaler Auftrennung in Polyacrylamidgelen erhaltenen Kreuzreaktionen der Proteine aus Chloroplastenribosomen dargestellt. Insgesamt konnten durch Immunoblotting für elf Proteinen aus Chloroplastenribosomen gezeigt werden, daß sie immunologisch mit ribosomalen Proteinen aus E. coli verwandt sind. Kreuzreaktionen der Proteine aus Chloroplastenribosomen wurden mit den Antiseren gegen die E. coli-Proteine S7, S9, S11, S12, S14 oder S19, L1, L2, L3, L6, L13 und L17 gefunden.

Das Serum gegen das Protein S19 enthielt eine bereits bekannte Kontamination mit Antikörpern gegen das Protein S14. Das kreuzreagierende Protein aus Chloroplasten wurde S19 zugeordnet, da ein Serum gegen Protein S14 keine Kreuzreaktion ergab und das kreuzreagierende Protein aus Chloroplastenribosomen auch hinsichtlich seiner elektrophoretischen Eigenschaften dem Protein S19 aus E. coli ähnlicher ist als Protein S14.

Texte zu den nachfolgenden Bildern 32 und 33.

Bild 32: Zusammenstellung der experimentellen Ergebnisse zur Demonstration der Kreuzreaktion von Protein L2 aus E. coli und Chloroplasten. (A) Trennung von jeweils 35 µg TP50 durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Links: Elektrophorese von Proteinen aus E. coli (E.c.) und Spinatchloroplasten (Cpl.) in einem Gel zum Molekulargewichtsvergleich. Das Molekulargewicht des kreuzreagierenden Proteins aus Chloroplastenribosomen ist mit dem von E. coli-L2 fast identisch. Rechts: Streifen mit elektrophoretisch getrennten Proteinen aus E. coli und Chloroplasten. Jeweils normale Inkubation und Inkubation nach Absättigung des Serums mit E. coli-L2. Die Pfeile markieren die unterdrückten Banden. (B) Nachweis der Kreuzreaktion nach Trennung der Proteine auf einem Celluloseacetatgel. Kurzelektrophorese 40 Min. (1) und (3) 50 µg TP50 aus E. coli, (2)und (4) 50 µg TP50 aus Spinatchloroplasten. (1) und (2) Coumassieblaufärbung des Celluloseacetatgels, (3) und (4) Immunreaktion der auf Nitrocellulose übertragenen Proteine mit Antiserum gegen L2. Sowohl das Protein L2 aus E. coli als auch das kreuzreagierende Protein aus Chloroplasten sind sehr basische Proteine. (C) Nachweis der Kreuzreaktion nach Trennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Mets und Bogorad und Identifizierung des kreuzreagierenden Proteins aus Chloroplasten. (D) wie (C), jedoch Auftrennung der Proteine durch 2D-Elektrophorese nach Geyl et al. Die Kreuzreaktionen in (A), (B) und (C) wurden durch peroxydasekonjugierte Antikörper nachgewiesen, in (D) durch fluoresceinkonjugierte.

Bild 33: Zusammenstellung der experimentellen Ergebnisse zur Demonstration der Kreuzreaktion von Protein L1 aus E. coli und Chloroplasten. (A) Trennung von jeweils 35 µg TP50 durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Links: Elektrophorese von Proteinen aus E. coli (E.c.) und Spinatchloroplasten (Cpl.) in einem Gel zum Molekulargewichtsvergleich. Das Molekulargewicht des kreuzreagierenden Proteins aus Chloroplastenribosomen ist etwas größer (ca. 30 K) als das von E. coli-L1. Rechts: Streifen mit elektrophoretisch getrennten Proteinen aus E. coli und Chloroplasten. Jeweils normale Inkubation und Inkubation nach Absättigung des Serums mit E. coli-L1. Die Pfeile markieren die unterdrückten Banden. (B) Nachweis der Kreuzreaktionen nach Trennung der Proteine auf einem Celluloseacetatgel. (1) und (4) 50 µg TP50 aus E. coli, (2) und (5) 50 µg TP50 aus Spinatchloroplasten, (3) und (6) 5 µg einer Proteinfraktion aus Spinatchloroplastenribosomen (Fraktion 69, siehe Kap. 7.1.). (1) bis (3) Coumassieblaufärbung des Celluloseacetatgels, (4) bis (6) Immunreaktion der auf Nitrocellulosepapier übertragenen Proteine mit dem Antiserum gegen E. coli-L1. (C) Nachweis der Kreuzreaktion nach Trennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Mets und Bogorad und Identifizierung des kreuzreagierenden Proteins aus Chloroplasten. Das kreuzreagierende Protein aus Chloroplasten ist etwas größer und nicht so basisch wie Protein L1 aus E. coli.

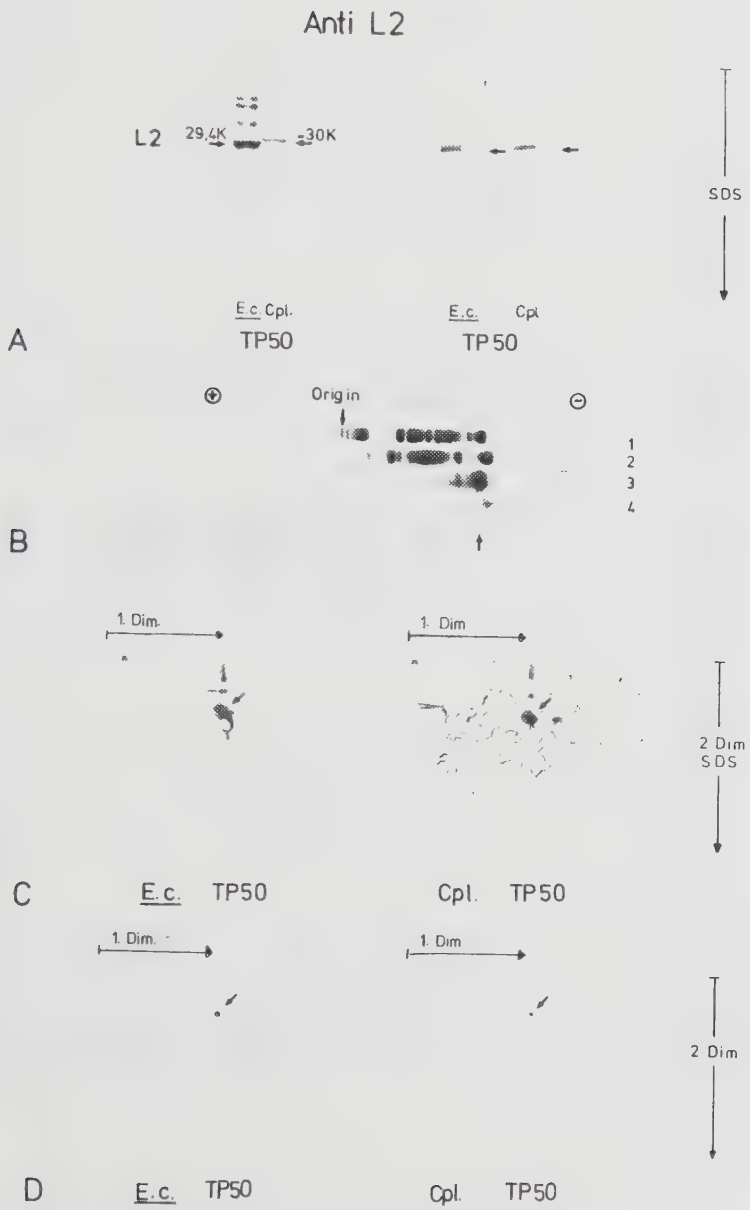

Anti L2
L2
29,4K
30K
SDS
E.c. Cpl.
TP50
E.c.
Cpl
TP50
A
Origin
1
2
3
4
B
1. Dim.
1. Dim
2 Dim
SDS
C
E.c.
TP50
Cpl.
TP50
1. Dim.
1. Dim
2 Dim
D
E.c.
TP50
Cpl.
TP50

Bild 32.

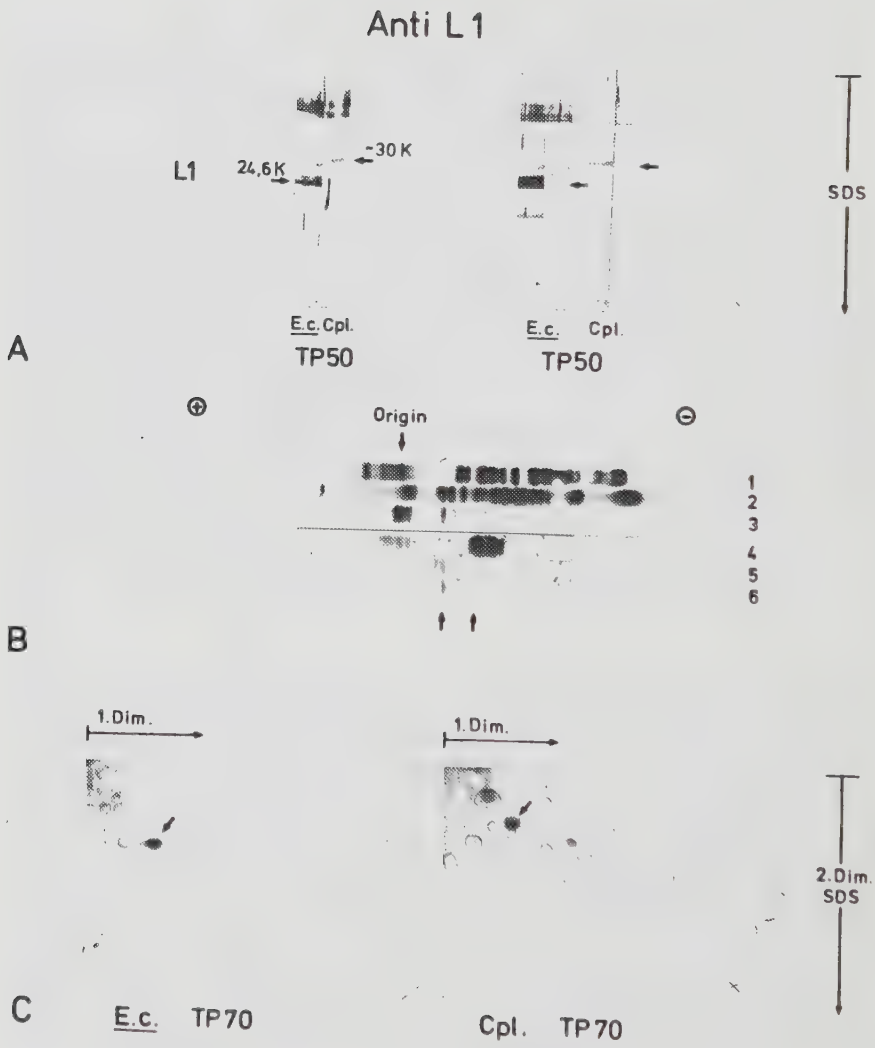

Anti L1
L1
24,6K
~30K
SDS
E.c. Cpl.
TP50
E.c. Cpl.
TP50
A
Origin
1
2
3
4
5
6
B
1.Dim.
1.Dim.
2.Dim.
SDS
C
E.c. TP70
Cpl. TP70

Bild 33.

Tab. 17: Auflistung der Experimente, in denen mit Seren gegen E. coli-Proteine Kreuzreaktionen mit Proteinen aus Chloroplastenribosomen nachgewiesen wurden.

	1D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen			2D-Polyacrylamid-gelelektrophorese	Celluloseacetat-gelelektrophorese
	Teststreifen	Koelektrophorese	Absättigung		
Anti-S7	FITC Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	FITC Peroxydase	nicht bestimmt
Anti-S9	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	nicht bestimmt
Anti-S11	FITC Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	FITC Peroxydase	nicht bestimmt
Anti-S12	FITC Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	FITC Peroxydase	nicht bestimmt
Anti-S14/19	FITC Peroxydase	Peroxydase	nicht bestimmt	FITC Peroxydase	nicht bestimmt
Anti-L1	FITC Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	FITC Peroxydase	Peroxydase
Anti-L2	FITC Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	FITC Peroxydase	Peroxydase
Anti-L3	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	nicht bestimmt
Anti-L6	FITC Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	nicht bestimmt
Anti-L13	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase
Anti-L17	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	Peroxydase	nicht bestimmt

Die Tabelle enthält die Angaben über die verwendeten Seren, die jeweilige Elektrophorese und die Art der Anti-Antikörper (FITC oder Peroxydase = fluorescein- oder peroxydasekonjugierte Antikörper). Das verwendete Serum gegen Protein S19 enthielt auch Antikörper gegen Protein S14 (bekannte Verunreinigung). Eine Absättigungskontrolle wurde nicht durchgeführt, da das Protein S19 nicht rein zur Verfügung stand.

Tab. 18: Vergleich der kreuzreagierenden Proteine aus E. coli- und Chloroplastenribosomen.

	Molekulargewicht in E. coli	Molekulargewicht und rel. Ladung in Spinatchloroplasten
S7K	19.7 K	fast identisch, etwas basischer
S7B	17.1 K	
S9	14.6 K	fast identisch, etwas weniger basisch
S11	13.7 K	beide fast identisch
S12	13.6 K	beide fast identisch
S19	10.3 K	beide fast identisch
L1	24.6 K	ca. 30 K, etwas weniger basisch
L2	29.4 K	beide fast identisch
L3	22.3 K	beide fast identisch
L6	18.8 K	beide fast identisch
L12	12.2 K	beide fast identisch
L13	16.0 K	ca. 20 K, fast identisch
L17	14.4 K	fast identisch, basischer

Bildtexte zu den nachfolgenden Bildern 34 und 35.

Bild 34: Demonstration der Kreuzreaktion zwischen ribosomalen Proteinen aus E. coli und Chloroplasten auf Nitrocellulosepapier nach Auftrennung der Proteine (TP30) auf zweidimensionalen Polyacrylamidgelen (Mets und Bogorad). Nachweis der Antigen-Antikörperkomplexe mit peroxydasekonjugierten Antikörpern. Oben: Schema mit den Positionen der kreuzreagierenden Proteine. Unten: Einzelergebnisse. Jeweils links: Reaktion der angegebenen Antiseren mit E. coli-Protein, jeweils rechts: Reaktion der angegebenen Antiseren mit Chloroplastenprotein.

Bild 35: Demonstration der Kreuzreaktion zwischen ribosomalen Proteinen aus E. coli und Chloroplasten auf Nitrocellulosepapier nach Auftrennung der Proteine (TP50) auf zweidimensionalen Polyacrylamidgelen (Mets und Bogorad), wie Bild 34.

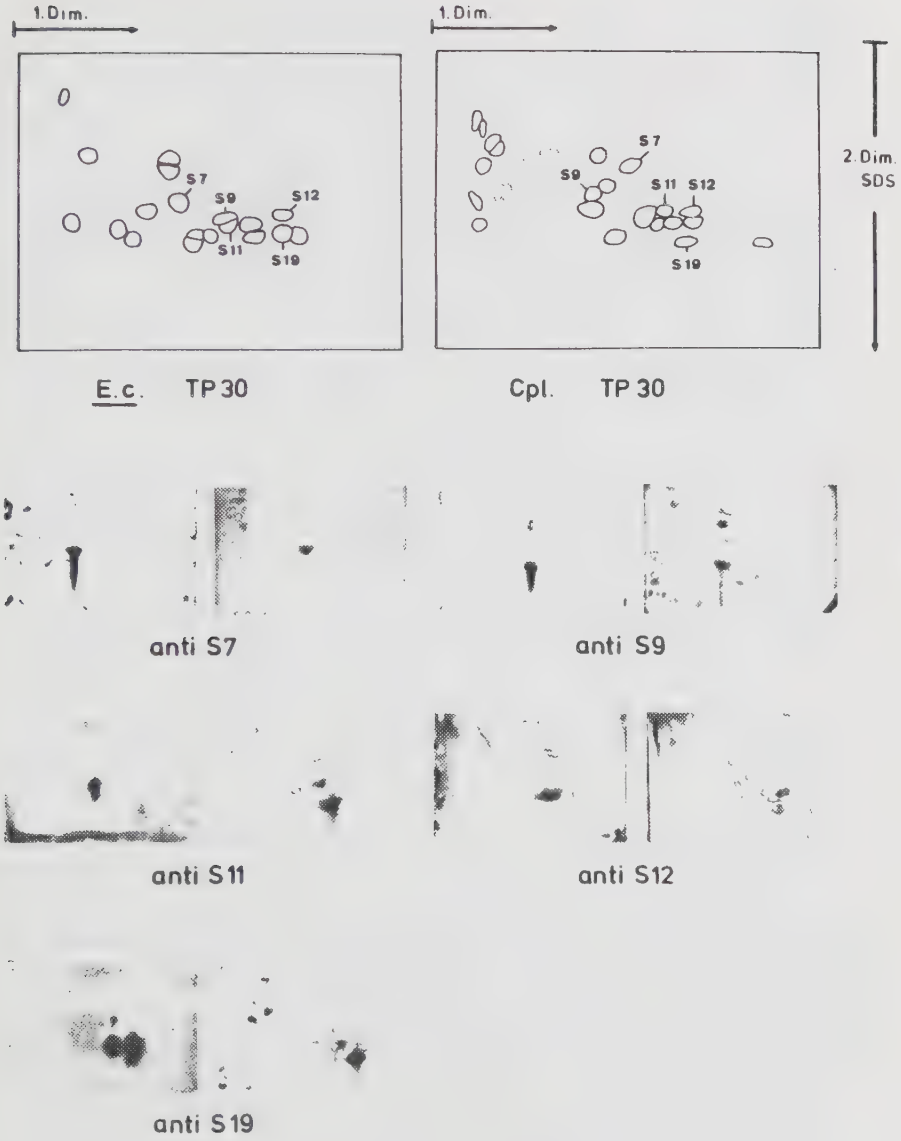
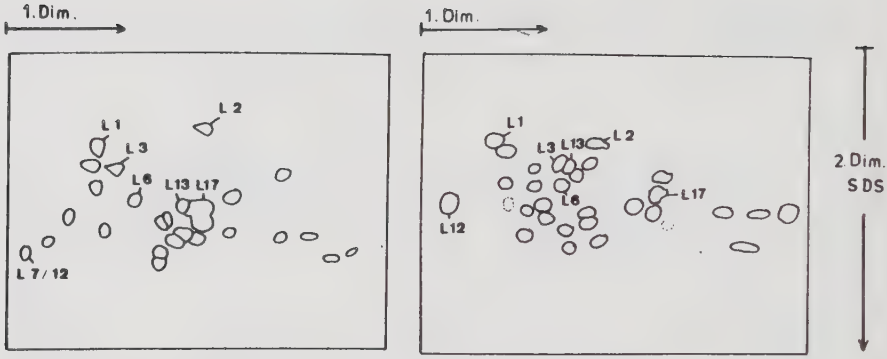

1. Dim.
S7
S9
S12
S11
S19
1. Dim.
S7
S9
S11
S12
S19
2. Dim.
SDS
E.c. TP 30
Cpl. TP 30
anti S7
anti S9
anti S11
anti S12
anti S19

Bild 34:



E. c. TP 50

Cpl. TP 50

anti L1

anti L2

anti L 3

anti L 6

anti L13

anti L 17

Bild 35:

In den meisten Fällen haben die kreuzreagierenden Proteine aus Chloroplastenribosomen eine sehr ähnliche elektrophoretische Mobilität (Molekulargewicht und Ladung) wie die Proteine aus E. coli (Bild 34, 35 und Tabelle 18). Nur mit den Seren gegen die ribosomalen Proteine L1 und L13 aus E. coli wurden Proteine in Chloroplastenribosomen nachgewiesen, deren Molekulargewicht etwas größer als in E. coli ist. Die Celluloseacetatgelelektrophoresen ergaben, daß die Ladung dieser beiden Proteine in E. coli und Chloroplasten jedoch nicht sehr verschieden ist. In Kapitel 4 wurde hervorgehoben, daß Chloroplastenribosomen einige Proteine mit einem etwas höheren Molekulargewicht als E. coli-Ribosomen besitzen. Die Kreuzreaktionen der Proteine L1 und L13 zeigen, daß in zumindest zwei Fällen diese höhermolekularen Proteine keine zusätzlichen Proteine der Chloroplastenribosomen sind, sondern etwas kleineren Proteinen aus E. coli zugeordnet werden können.

Zu den wenigen Proteinen aus Chloroplastenribosomen, die eine unterschiedliche Ladung als die entsprechenden Proteine aus E. coli besitzen, gehört das mit Anti-E. coli-L17 kreuzreagierende Protein. Dieses ist bei ähnlichem Molekulargewicht basischer als das Protein aus E. coli.

Da die meisten kreuzreagierenden Proteine aus Chloroplastenribosomen ähnliche elektrophoretische Eigenschaften haben wie die entsprechenden E. coli-Proteine, und da sie auch jeweils derselben Untereinheit angehören, ist es sehr wahrscheinlich, daß die gezeigten Reaktionen zwischen den ribosomalen Proteinen aus Chloroplasten und E. coli durch einander entsprechende, homologe Proteine hervorgerufen werden und nicht durch zufällige, identische, kurze Aminosäuresequenzen in einander nicht entsprechenden Proteinen. Gegen zufällig hervorgerufene Kreuzreaktionen spricht auch, daß die verschiedenen ribosomalen Proteine aus E. coli, bei denen insgesamt acht Hexapeptide, 35 Pentapeptide und eine große Zahl von Tetrapeptiden mit identischer Aminosäuresequenz in jeweils zwei Proteinen vorkommen, auch bei Anwendung der Methoden, mit denen es möglich ist, einzelne antigene Determinanten nachzuweisen, nicht untereinander kreuzreagierten (Immunelektronenmikroskopie und andere, Stöffler und Wittmann 1977).

Bei zumindest einem kreuzreagierenden Protein aus Chloroplastenribosomen ist die N-terminale Aminosäuresequenz mit der des entsprechenden Proteins aus E. coli homolog. Das mit E.coli-S7 kreuzreagierende Protein aus Chloroplastenribosomen wurde bereits in Kapitel 7 (dort als Protein b1 bezeichnet) aufgrund seiner N-terminalen Aminosäuresequenz dem Protein E. coli-S7 zugeordnet.

Insgesamt konnten mit nur etwa einem Drittel der getesteten Antiseren Kreuzreaktionen der ribosomalen Proteine aus Chloroplasten nachgewiesen werden. Negative oder nicht eindeutige Ergebnisse auf Teststreifen wurden mit Seren gegen die ribosomalen Proteine S1, S3, S4, S5, S6, S8, S10, S14, S16, S17, S20/L26, L4, L5, L7/12, L9, L10, L11, L15, L18, L19, L22, L24, L25 und L29 erhalten. Sehr wahrscheinlich gibt es weitere homologe Proteine, die immunologisch nachgewiesen werden könnten, wenn weitere Antiseren ausgetestet würden. Für Kreuzreaktionen kann die Wahl der zu immunisierenden Tierspezies eine Rolle spielen. So ist bekannt, daß Kaninchen und Hammel nach Immunisierung mit denselben Proteinen Antikörper gegen verschiedene Epitope bilden. Andererseits könnten die Homologien zwischen den ribosomalen Proteinen aus Chloroplasten und E. coli so schwach sein, daß sie auch durch Immunoblotting nicht nachweisbar sind.

Antikörper können entweder gegen Aminosäuresequenzen (Primärstruktur) oder gegen Proteinkonformation (Tertiärstruktur) gerichtet sein. Die minimale Größe einer immunogenen Determinante sind vier aufeinander folgende Aminosäure. Allerdings werden oft bis zu zehn Aminosäurereste für eine Antikörperbindungsstelle benötigt (Sela et al. 1969). Antikörper gegen ribosomale Proteine sind hauptsächlich gegen Peptidsequenzen (Primärstrukturen) gerichtet. Eine Ausnahme bildet das Protein L7/12, gegen das neben sequenzspezifischen Antikörpern (ca. 30%) auch konformationsspezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten (Stöffler 1974).

Durch die in dieser Arbeit angewendete Methode Immunoblotting konnten ausschließlich sequenzspezifische Antikörper nachgewiesen werden, da in den Inkubationspuffern Detergenzien verwendet wurden, die Tertiärstrukturen von Proteinen zerstören. Möglicherweise wird die Reaktivität einiger Aminosäuresequenzen

auch durch bestimmte Detergenzien verringert, so daß zum Nachweis solcher Determinanten andere Inkubationspuffer verwendet werden müßten.

Aus negativen Ergebnissen mit Antiseren gegen einzelne E. coli-Proteine kann nicht geschlossen werden, daß zu diesen Proteinen homologe Proteine in Chloroplastenribosomen nicht existieren.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeklärte Primärstruktur von Cpl L12 und erst kürzlich durch DNS-Sequenzierung bestimmte Sequenzen des Proteins S19 aus Tabakchloroplasten (Sugita und Sugiura 1983) und S4 aus Maischloroplasten (Subramanian et al. 1983) erlauben den Vergleich der immunologischen Ergebnisse mit den Primärstrukturen dieser Proteine.

Relativ einfach zu erklären wäre die mit dem Antiserum gegen E. coli-S19 erhaltene Kreuzreaktion. Das durch DNS-Sequenzierung vorausgesagte Protein S19 aus Tabakchloroplasten ist Protein S19 aus E. coli sehr ähnlich. Das Molekulargewicht ist fast identisch und 55% der Aminosäurereste in beiden Proteinen stimmen überein. Die Aminosäuresequenzen ergeben zwei gemeinsame Pentapeptide und ein gemeinsames Oktapeptid (Bild 36). Vor allem das gemeinsame Oktapeptid MVGHKLGE kann die beobachtete Kreuzreaktion hinreichend erklären. Ob dieses Oktapeptid tatsächlich die Kreuzreaktion hervorruft, könnte mit Antiseren gegen Fragmente von E. coli-S19 untersucht werden.

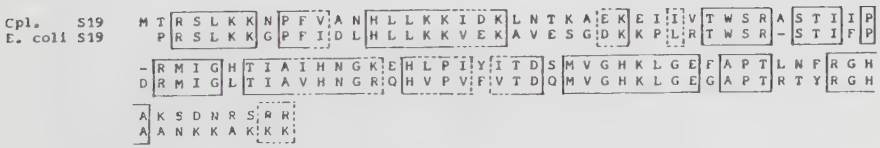


Bild 36: Strukturvergleich des Proteins S19 aus Tabakchloroplasten und E. coli.

Das Protein S4 dagegen wäre ein Beispiel für ein Protein, bei dem es nicht möglich sein könnte, die Sequenzhomologie durch Immunoblotting nachzuweisen. Keines von vier getesteten Antiseren gegen E. coli-S4 ergab eine Kreuzreaktion mit Chloroplastenproteinen. Die homologen Aminosäuren in den Proteinen S4 aus Chloroplasten und E. coli sind so verteilt, daß sich keine längeren gemeinsamen Sequenzen ergeben. Das einzige gemeinsame Pentapeptid ARQLV reicht wahrscheinlich für eine Kreuzreaktion nicht aus.

Sehr interessant ist, daß keine Kreuzreaktion von Cpl L12 durch Immunoblotting nachgewiesen werden konnte, obwohl hierzu verschiedene Seren auch gegen Fragmente von Protein L12 verwendet wurden. Eine Kreuzreaktion wäre wegen der Sequenzhomologie zu E. coli-L12 (siehe Bild 20) zu erwarten gewesen. Diese konnte auch mit der weniger empfindlichen Methode nach Ouchterlony, allerdings nur mit Ribosomen und extrahiertem Totalprotein, nicht jedoch mit dem isolierten Protein Cpl L12 gezeigt werden.

Diese Ergebnisse können eigentlich nur damit erklärt werden, daß für die Kreuzreaktion von Cpl L12 die Tertiärstruktur eine Rolle spielt und diese bei der Isolierung des Proteins oder der Inkubation mit Detergenzien verloren geht. Daß die Tertiärstruktur im Gegensatz zu anderen Proteinen bei Antikörpern gegen das Protein L12 eine größere Rolle spielt, wurde bereits oben erwähnt.

Auffällig ist, daß vor allem die kreuzreagierenden Proteine der 50S-Untereinheit zu den größeren ribosomalen Proteinen gehören. Dieses könnte statistisch erklärt werden. Bei gleicher Homologie können sich in den größeren Proteinen gemeinsame längere Peptidsequenzen eher ergeben als in den kleinen ribosomalen Proteinen.

Andererseits könnten die beobachteten Kreuzreaktionen auch dafür sprechen, daß sich einige funktionell oder strukturell besonders wichtige Proteine während der Evolution nur wenig verändert haben. Die kreuzreagierenden Proteine S11 und S12 gehören zusammen mit S4 und S5 in E. coli zu einer Gruppe von Proteinen, die im Zusammenhang mit der Translationsgenauigkeit und der Reaktion auf Streptomycin eine Rolle spielen. Der für eubakterielle Ribosomen typische, durch Streptomycin hervorgerufene Lesefehler (Isoleucin statt Phenylalanin) bei der Poly(U)-

abhängigen Poly(Phe)-Synthese wird auch in den Chloroplastenribosomen gefunden.

Viele der in Chloroplasten kreuzreagierenden Proteine gehören zu den ribosomalen Proteinen, die mit klassischen immunologischen Methoden in allen untersuchten, relativ entfernt verwandten Bakterien nachzuweisen waren (S7, S11, S19, L12, Geisser et al. 1973). Die kreuzreagierenden Proteine S7, S9 und S19 lassen in den Assemblymodellen der ribosomalen 30S-Untereinheit eine Gruppierung erkennen (Nomura und Held 1974). Protein S7 bindet am 3'-terminalen Ende der 16S-RNS und vermittelt Bindungsstellen für die Proteine S9 und S19.

In der großen Untereinheit sind die kreuzreagierenden Proteine über alle Bereiche des Assemblymodells (Nierhaus 1980) verteilt. L1, L2, L3 und L17 sind Proteine, die an verschiedene Bereiche der 23S-RNS binden. L3 ist eines der beiden Initiatorproteine, die in der frühen Phase der Assemblierung des Ribosoms benötigt werden. L6 und L7/12 sind dagegen in der Spätphase der Rekonstitution des Ribosoms wichtig.

Es wäre sinnvoll, die kreuzreagierenden, strukturhomologen ribosomalen Proteine aus Chloroplasten nach den ribosomalen Proteinen aus E. coli zu bezeichnen, z.B. Cpl L1 u.s.w.. Die restlichen Proteine könnten bis zur Klärung ihrer Identität numeriert werden. Die mit den immunologischen Methoden erreichte Zuordnung der ribosomalen Proteine aus Chloroplasten und E. coli kann für die Interpretation bereits veröffentlichter Daten nützlich sein. So wurden von Eneas-Filho et al. (1981) durch Inkubation intakter Chloroplasten mit radioaktiven Aminosäuren ribosomale Proteine bestimmt, deren Biosynthese in Chloroplasten stattfindet. Aufgrund ihrer charakteristischen Mobilität können die mit E. coli-S7 und -L2 kreuzreagierenden Spinatchloroplastenproteine Cpl S7 und Cpl L2 den von Eneas-Filho et al. beschriebenen Erbsenchloroplastenproteinen S9 und L4 zugeordnet werden. Dies würde bedeuten, daß die zu E. coli-S7 und -L2 homologen Proteine der Organellenribosomen durch das Chloroplastengenom kodiert werden. Andere, dort beschriebene Erbsenproteine können nicht so eindeutig den Spinatchloroplastenribosomenproteinen zugeordnet werden. Hierfür wären Koelektrophoresen der ribosomalen Proteine aus Erbsen-und Spinatchloroplasten in einem Gel notwendig.

9. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

9. 1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Charakterisierung ribosomaler Proteine aus Chloroplasten höherer Pflanzen (Spinacia oleracea).

Es wurde zunächst eine effektive Methode zur Isolierung großer Mengen Chloroplastenribosomen erarbeitet.

Nach Charakterisierung der isolierten Organellenribosomen wurde von den ca. 55 ribosomalen Proteinen das oft als phylogenetisch besonders interessant bezeichnete ribosomale "A-Protein" isoliert und durch manuellen Mikro-Edman-Abbau dessen Primärstruktur vollständig bestimmt.

Das ribosomale "A-Protein" Cpl L12 aus Spinatchloroplasten besteht aus 130 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 13576. Es besitzt ähnliche Struktureigenschaften wie die aus Eubakterien isolierten ribosomalen "A-Proteine". Etwa 50% der Aminosäurereste des Chloroplastenproteins Cpl L12 sind identisch mit denen aus E. coli-L12. Eine etwaige Homologie zu den aus 80S-Ribosomen isolierten ribosomalen "A-Proteinen" konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Die nach der Isolierung von Cpl L12 verbliebenen ribosomalen Proteine aus Chloroplasten (1,5 g) wurden durch Gelfiltration fraktioniert, um sie für spätere Untersuchungen verwenden zu können.

Um zu untersuchen, ob es möglich ist, weitere Sequenzhomologien oder einander entsprechende Proteine in so verschiedenen Ribosomen wie denen aus Chloroplasten und E. coli nachzuweisen, wurde eine sehr empfindliche immunologische Methode (Immunoblotting) angewendet, mit der außer der Demonstration von Kreuzreaktionen auch die elektrophoretische Charakterisierung des kreuz-

reagierenden Antigens möglich ist. Mit Antikörpern gegen einzelne ribosomale Proteine konnte für elf der ca. 55 Proteine der Chloroplastenribosomen eine Kreuzreaktion mit ribosomalen Proteinen aus E. coli gezeigt werden (S7, S9, S11, S12, S19 oder S14, L1, L2, L3, L6, L13 und L17). Die kreuzreagierenden Proteine aus Chloroplastenribosomen wurden durch ihre Mobilität bei der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert. Die Molekulargewichte und Nettoladungen dieser wahrscheinlich einander entsprechenden Proteine aus Chloroplasten- und E. coli-Ribosomen sind jeweils relativ ähnlich.

9. 2. Die Verwandtschaft der ribosomalen "A-Proteine" aus Prokaryonten, Eukaryonten und Zellorganellen.

Ribosomale Proteine sind sehr gut geeignet, um die Evolution von Proteinen in verschiedenen Organismen zu untersuchen oder phylogenetische Verwandtschaften aufzudecken. Obwohl ribosomale Proteine in allen Organismen vorkommen und die Zuordnung einander entsprechender ribosomaler Proteine innerhalb der Eubakterien einerseits und der Archaebakterien/Eukaryonten andererseits im allgemeinen relativ leicht durch Vergleich der Aminosäurereste möglich ist, ist erst ein einziges ribosomales Protein, das dem E. coli-Protein L7/12 entsprechende sog. ribosomale "A-Protein", bekannt, von dem allgemein angenommen wird, daß seine Evolution von Eubakterien, Archaebakterien über Hefen zu höheren Pflanzen und Tieren (Invertebraten und Vertebraten) verfolgt werden kann. Selbst die phylogenetische Verwandtschaft der verschiedenen ribosomalen "A-Proteine" ist keineswegs offensichtlich, und möglicherweise handelt es sich bei den bisher isolierten eukaryontisch/archaebakteriellen "A-Proteinen" gar nicht um die gesuchten, mit E. coli-L7/12 verwandten Proteine. Da eine etwaige Verwandtschaft der eubakteriellen und der eukaryontisch/archaebakteriellen ribosomalen "A-Proteine" im Zusammenhang mit der Evolution des Proteins Cpl L12 aus Chloroplasten steht, soll das Problem der ribosomalen "A-Proteine" im folgenden diskutiert werden.

Schon sehr früh wurde mit immunologischen Methoden die Ex-

istenz zu E. coli-Protein L7/12 homologer Proteine nicht nur in Eubakterien, sondern auch in Rattenleber- und Heferibosomen beschrieben (Wool und Stöffler 1974). Kreuzreaktionen wurden sowohl mit Antikörpern gegen E. coli-L7/12 als auch mit Antikörpern gegen das Rattenleberprotein L40/41 und gegen saure Hefeproteine erhalten. Auch mit Funktionstests in pro- und eukaryontischen Systemen konnten Kreuzreaktionen nachgewiesen werden (Wool und Stöffler 1974, Howard et al. 1976, Grasmuk et al. 1977).

Leider konnten die kreuzreagierenden Proteine Rattenleber-L40/41 nicht wieder isoliert werden. In der Folgezeit wurden negative, widersprüchliche immunologische Ergebnisse erhalten (Matheson et al. 1980), so daß die bisherigen immunologischen Ergebnisse in Frage gestellt oder nicht weiter beachtet wurden.

Parallel zu den immunologischen Experimenten wurden aus verschiedenen Eukaryonten Proteine isoliert, die den mehrfach phosphorylierbaren Proteinen P1 und P2 aus Rattenleberribosomen entsprechen. Diesem Proteinpaar ähnliche Proteine wurden aus Artemia salina (EL7 und EL12), aus Hefe (YP-A1 und YP-A2), aus Weizen und sogar aus Archaebakterien isoliert. Wie E. coli-L7/12 sind diese Proteine saure Proteine (isolelektrischer Punkt um pH 4,0) mit einem ähnlichen Molekulargewicht (ca. 12000) und einer relativ ähnlichen Aminosäuezusammensetzung (alaninreich).

Sie können wie die eubakteriellen ribosomalen "A-Proteine" modifiziert werden (Phosphorylierung).

Die eukaryontischen, sauren Phosphoproteine lassen sich wie alle eubakteriellen ribosomalen "A-Proteine" nach der Methode von Hamel et al. (1972) aus Ribosomen extrahieren und kommen wie E. coli-L7/12 in mehreren Kopien pro Ribosom vor. Es wurde wiederholt betont, daß die Phosphoproteine dem Protein E. coli-L7/12 funktionell entsprechen, d.h. zur elongationsfaktorabhängigen GTP-Hydrolyse notwendig sind. Allerdings wurden für diese Versuche nach Hamel et al. extrahierte Fraktionen , die auch andere Proteine enthalten, und nicht weiter aufgereinigte Proteine verwendet.

Die Primärstrukturen der eukaryontischen Phosphoproteine sind einander sehr ähnlich (zwischen 40 und 60% identische Aminosäurereste in verschiedenen Organismen),und die phylogenetische

Verwandtschaft läßt sich eindeutig von Vertebraten (Rattenleber), Invertebraten (Artemia salina), Pflanzen (Weizen), Hefe (Saccharomyces cerevisiae) bis in Archaebakterien (Halobacterium cutirubrum, Methanobacterium thermautotrophicum) verfolgen (Matheson et al. 1980). Die Phosphoproteine werden wegen der beschriebenen Ähnlichkeiten zu E. coli-L7/12 heute auch als die eukaryontisch/archaebakteriellen "A-Proteine" bezeichnet.

Der Vergleich ihrer Primärstrukturen mit denen der eubakteriellen ribosomalen "A-Proteine" ergibt zunächst gar keine Homologie der Proteine. Um dennoch eine Homologie zu erhalten und damit einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung zu erklären, nehmen einige Autoren an, daß während der frühen Evolution drastische Veränderungen wie Transpositionen oder Duplikationen und Insertionen oder Deletionen in den "A-Proteinen" einer Linie stattgefunden haben (Amons et al. 1979, Matheson et al. 1980, Lin et al. 1982). Der Grund hierfür ist, daß in den beiden Typen der ribosomalen "A-Proteine" (eubakterieller und eukaryontisch/archaebakterieller Typ) drei bis vier kurze, jeweils zehn Aminosäurereste lange Sequenzen existieren, die eine zweifelhafte Homologie ergeben könnten, wenn sie in anderer Reihenfolge angeordnet wären (Region A, B, C und F nach Matheson et al. 1980).

Im Gegensatz zu Matheson et al. versuchten Lin et al. (1982), den gemeinsamen Ursprung der ribosomalen "A-Proteine" durch eine einzige Transposition zu erklären. Leider wurde von den Autoren nur Zahlenmaterial und ein Schema präsentiert, nicht jedoch die tatsächliche Zuordnung der Aminosäurereste der verglichenen Proteine.

Eine andere Möglichkeit, die Ähnlichkeit der beiden Typen der ribosomalen "A-Proteine" zu erklären, wurde von Itoh (1981) vorgeschlagen. Hiernach könnten sich die Strukturen und Funktionen zweier verschiedener, nicht verwandter Proteine durch Konvergenz einander angeglichen haben. So besitzt das aktive Zentrum der phylogenetisch nicht verwandten Serinproteasen Chymotrypsin und Subtilisin, eine ähnliche Aminosäuresequenz.

Die Primärstruktur des ribosomalen "A-Proteins" aus Chloroplasten Cpl L12 bringt keine Klärung der kontroversen Stand-

punkte. Eine Homologie dieses Proteins kann nur zu den eubakteriellen ribosomalen "A-Proteinen" nachgewiesen werden. Das Organellenprotein Cpl L12 ist also kein Bindeglied zwischen den verschiedenen Typen ribosomaler "A-Proteine". Dieses Ergebnis wäre in guter Übereinstimmung mit der Endosymbiontenhypothese und dem aus der Struktur der 5S-RNS-Moleküle abgeleiteten Stammbaum der Lebewesen (siehe Kap. 2, Bild 2). Allerdings ist es in Anbetracht der mit dem Rattenleberprotein L40/41 erhaltenen immunologischen Ergebnisse (Kreuzreaktion und Funktionshemmung) nicht unmöglich, daß ein dem Protein L7/12 aus E. coli besser entsprechendes Protein der 80S-Ribosomen aus Eukaryonten noch gefunden wird. Wegen der Verschiedenheit zu E. coli-L12 können die Primärstrukturen der Phosphoproteine (P1, P2, YP-A1 und YP-A2) nicht zur Erklärung der oben erwähnten, in der Literatur beschriebenen immunologischen Ergebnisse herangezogen werden.

9. 3. Strukturähnlichkeiten der Ribosomen aus Chloroplasten höherer Pflanzen und E. coli

Das Protein Cpl L12 ist nicht das einzige Chloroplastenprotein, das homolog zu den eubakteriellen ribosomalen Proteinen ist. Erst kürzlich wurden zwei DNS-Sequenzen des Chloroplastengenoms bekannt, die sehr wahrscheinlich die Gene der den E. coli-Proteinen S4 und S19 entsprechenden Proteine darstellen. Die aus der DNS-Sequenz abgeleitete Primärstruktur von Cpl S19 (Tabak)ergibt mit E. coli-S19 eine Homologie von 55%, die von Cpl S4 (Mais) ist etwas geringer als 50% (Sugita und Sugiura 1983, Subramanian et al. 1983). Die Homologie dieser Proteine liegt also in der gleichen Größenordnung wie die von Protein L12 aus Spinatchloroplasten und E. coli.

Die Bindungsstellen bestimmter Antibiotika an die Ribosomen werden vor allem durch die ribosomalen Proteine bestimmt. Sie sind in Chloroplasten- und Bakterienribosomen wahrscheinlich ähnlich; denn alle Antibiotika, die die Proteinbiosynthese in Eubakterien hemmen, wirken auch auf die Proteinbiosynthese der Chloroplastenribosomen (siehe Kapitel 2).

Immunologisch konnte in der vorliegenden Arbeit die Kreuz-

reaktion des für die Streptomycinreaktion wichtigen Proteins S12 nachgewiesen werden.

Die Kontaktflächen der großen und kleinen Untereinheit (Interface) könnten in E. coli-und Chloroplastenribosomen eine ähnliche Struktur besitzen, da sich aktive 70S-Hybride aus heterologen Untereinheiten bilden lassen (Grivell und Walg 1972).

Der Strukturvergleich der RNS, die zwei Drittel der Masse des Ribosoms ausmacht, gibt weitere Hinweise darauf, daß sich die ribosomalen Proteine aus Chloroplasten und Eubakterien ähneln. Über 70% der Nukleotidsequenzen der großen RNS-Moleküle in Chloroplasten und E. coli sind identisch. Durch kompensierende (die Basenpaarung erhaltende) Basenaustausche ist die Ähnlichkeit der Sekundärstrukturen noch größer (Wittmann 1982). Die modifizierten Basen der 16S-RNS, die die dreidimensionale Struktur dieser RNS-Moleküle entscheidend beeinflußen, demonstrieren die Ähnlichkeit der dreidimensionalen Struktur der 16S-RNS-Moleküle in verschiedenen Organismen. Sowohl das N^6,N^6-Dimethyladenosin als auch das 7-Methylguanosin kommt in der Chloroplasten-16S-RNS in derselben Position innerhalb der Sequenz vor. Die immunelektronenmikroskopisch bestimmten Lokalisationen dieser modifizierten Basen stimmen in E. coli und Chloroplasten überein. Das N^6,N^6-Dimethyladenosin wurde auf der sog. Plattform der 30S-Untereinheit lokalisiert (Trempe und Glitz 1981), das 7-Methylguanosin gegenüber der Plattform der 30S-Untereinheit (Trempe et al 1982).

Es ist also nicht unwahrscheinlich, daß die RNS-Moleküle aus Chloroplasten und Eubakterien eine ähnliche Raumstruktur einnehmen können und deswegen auch ähnliche Bindungsstellen für ribosomale Proteine aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist die Bindungsstelle des ribosomalen Proteins L1 an die 23S-RNS. Sie wurde in E. coli und anderen Bakterien lokalisiert und charakterisiert (Branlant et al. 1981). Die entsprechende Region der 23S-RNS aus Chloroplasten enthält eine sehr ähnliche Nukleotidsequenz. Die für dieses RNS-Segment postulierten Basenpaarungen und Einzelstränge (Sekundärstrukturelemente) können sich auch in der Chloroplasten-23S-RNS ausbilden (Bild 37).

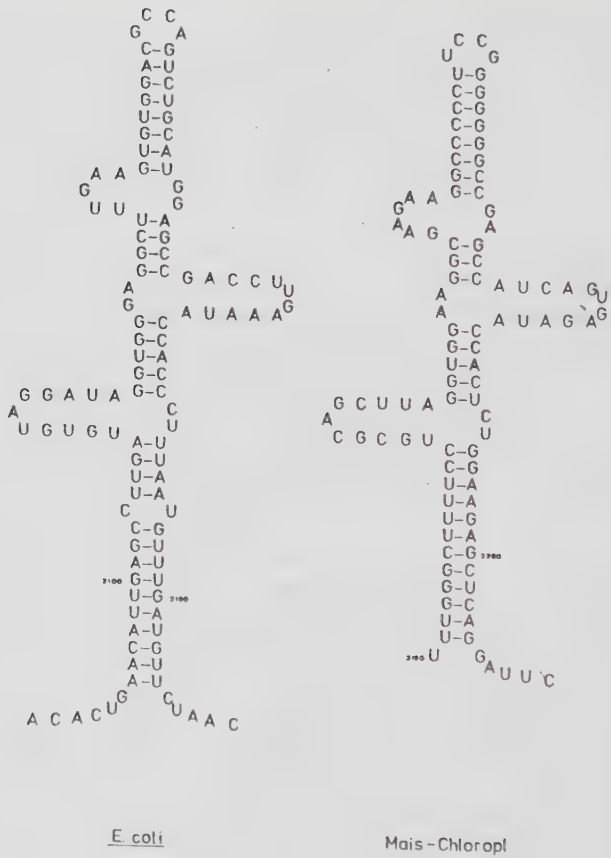


Bild 37: Vergleich der L1-Bindungsstelle der E. coli- und der Chloroplasten-23S-RNS.

Wie die Isolierung lebensfähiger, L1-freier Mutanten von E. coli zeigte, ist L1 zur Assemblierung oder Funktion des Ribosoms kein unbedingt notwendiges Protein. L1 ist ein Regulatorprotein und reguliert ein Operon mit dem Gen für Protein L11. L1-freie Mutanten zeigten eine signifikante Mehrproduktion von Protein L11 (Stöffler et al. 1981).

Interessanterweise existiert sehr wahrscheinlich

ein L1 entsprechendes Protein auch in so entfernt verwandten Ribosomen wie denen der Chloroplasten. Durch Immunoblotting wurde ein mit E. coli-L1 kreuzreagierendes Protein aus Chloroplasten identifiziert (siehe Kapitel 8). Die gegen Protein Cpl L12 und gegen Cpl L1 produzierten Antikörper (siehe Kapitel 7) könnten die immunelektronenmikroskopische Lokalisation dieser Proteine auf der 50S-Untereinheit der Chloroplastenribosomen ermöglichen.

9. 4. Ausblick

Ribosomale Proteine aus Chloroplasten sind nicht nur wegen ihrer Evolution interessant, sondern auch, weil die Gene dieser Proteine auf zwei Kompartimente (Chloroplast und Zellkern) verteilt sind. Die großen Mengen der während der hier beschriebenen Versuche fraktionierten ribosomalen Proteine aus Chloroplasten wären geeignet, Themen wie die Genlokalisation und den Import der Chloroplastenproteine und die Assemblierung der Chloroplastenribosomen weiter zu bearbeiten.

Die Vorgänge beim Transport der ribosomalen Proteine durch die Chloroplastenmembran sind bisher nicht geklärt. Es ist nicht bekannt, ob die zu transportierenden ribosomalen Proteine Signalsequenzen besitzen, die den Transport durch die Chloroplastenmembran erleichtern, oder ob dieser Transport passiv stattfindet. Die kleine Untereinheit (SS) der Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase enthält bspw. am N-terminalen Ende eine hydrophobe Sequenz, die nach dem Transport durch die Membran abgespalten wird.

Bisher ebenfalls unbekannt sind die Regulationsvorgänge, die bei der Assemblierung des Chloroplastenribosoms aus den Proteinen der beiden Zellkompartimente eine Rolle spielen. Für E. coli-Ribosomen existiert ein Assemblierungsmodell, in dem bestimmten Proteinen spezielle Funktionen (z.B. Initiatorproteine, RNS-bindende Proteine, Proteine der frühen und späten Assemblierungsphase) zugewiesen werden. Ob die Proteine der frühen Assemblierungsphase, von deren Bindung an die RNS die nachfolgende Bindung weiterer Proteine abhängt, durch die

Chloroplasten-DNS kodiert werden oder vorwiegend von der DNS des Zellkerns, kann heute noch nicht abschließend beantwortet werden. Immerhin ist das Gen für das frühe Assemblierungsprotein S4 ein Chloroplastengen (Subramanian et al. 1983). Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten immunologischen Untersuchungen (siehe Kapitel 8) erlauben es, Cpl L2 und Cpl S7 (entsprechen E. coli-L2 und -S7) Proteinen aus Erbsen zuzuordnen, die von Chloroplastengenom kodiert werden (Eneas-Filho 1981). Auch sie sind wie Protein S4 RNS-bindende ribosomale Proteine, die weitere Bindungsstellen für andere ribosomale Proteine vermitteln (primary binding proteins). Andererseits ist das Protein S19, das auch vom Chloroplastengenom kodiert wird (Sugita und Sugiura 1983), ein Protein, das erst später in das Ribosom integriert wird (Nierhaus 1982).

Die Gene für die Chloroplastenproteine S4 (Mais) und S19 (Tabak) wurden zufällig in sequenzierten DNS-Abschnitten gefunden (Dekodierung offener Leseraster). Mit den während dieser Arbeit vorfraktionierten ribosomalen Proteinen aus Chloroplasten könnten die Gene dieser Proteine gezielt auf der Chloroplasten- oder Kern-DNS lokalisiert werden. Hierzu müßten entweder die Proteine teilweise sequenziert und geeignete, diesen Sequenzen entsprechende Oligonukleotide synthetisiert werden. Die Oligonukleotide könnten dann zur Lokalisation der Gene mit DNS-Fragmenten hybridisiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, Antikörper gegen ribosomale Proteine zu verwenden. Hiermit könnte die entsprechende mRNS aus proteinsynthetisierenden Polysomen isoliert werden, die wiederum zur Genlokalisation mit DNS-Fragmenten hybridisiert werden müßte.

Die Aufklärung der Primärstrukturen ribosomaler Proteine aus Chloroplasten, wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene des Proteins Cpl L12,mit proteinchemischen Methoden dürfte wegen der Schwierigkeit, genügende Mengen von Protein zu isolieren, wahrscheinlich ein Einzelfall bleiben. Mit den schnellen DNS-Sequenzierungstechniken wird es möglich sein, die erhaltenen immunologischen Ergebnisse über die Proteine der Chloroplastenribosomen zu bestätigen und endgültige Aussagen über die ribosomalen Proteine aus Chloroplasten zu machen.

Literaturliste

1. Amons, R. & W. Möller. 1979.
Studies on the Acidic Proteins from the Large Subunit of Artemia salina Ribosomes.
siehe: Osawa et al. 1980: 601-608.

2. Amons, R., W. Pluijms, K. Roobol & W. Möller. 1983.
Sequence Homology between EF-1α-Chain of Elongation Factor 1 from Artemia salina and Elongation Factor EF-Tu from Escherichia coli.
FEBS Lett. 153: 37-42.

3. Barritault, D., A. Expert-Bezançon, M. Guerin & D. Hayes. 1976.
The Use of the Acetone Precipitation in the Isolation of Ribosomal Proteins.
Eur. J. Biochem. 63: 131-135.

4. Bartsch, M., M. Kimura & A.R. Subramanian. 1982.
Purification, Primary Structure, and Homology Relationships of a Chloroplast Ribosomal Protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6871-6875.

5. Beaven, G.H. & E.R. Holiday. 1952.
Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids.
Adv. Prot. Chem. 7: 319-386.

6. Bedbrook, J.R. & R. Kolodner. 1979.
The Structure of Chloroplast DNA.
Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 593-620.

7. Bogorad, L. 1975.
Evolution of Organelles and Eukaryotic Genomes.
Science 188: 891-898.

8. Bogorad, L. 1981.
Chloroplasts.
J. Cell Biol. 91: 256-270.

9. Boynton, G.E., N.W. Gilham & A.M. Lambowitz. 1980
Biogenesis of Chloroplast and Mitochondrial Ribosomes.
siehe: Chambliss et al. 1980: 903-950.

10. Branlant, Ch., A. Krol, M.A. Machatt, J. Pouyet, J.P. Ebel, K. Edwards & H. Kössel. 1981.
Primary and Secondary Structures of Escherichia coli MRE 600 23S Ribosomal RNA Comparison with Models of Secondary Structure for Maize Chloroplast 23S rRNA and for Large Portions of Mouse and Human 16S Mitochondrial rRNA.
Nucleic Acids Res. 9: 4302-4324.

11. Brosius, J., M. Palmer, P.J. Kennedy & H. Noller. 1978.
Complete Nucleotide Sequence of a 16S Ribosomal RNA Gene from Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4801-4805.

12. Brosius, J., T. Dull & H. Noller. 1980.
Complete Nucleotide Sequence of a 23S Ribosomal RNA Gene from Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 201-204.

13. Brownlee, G., F. Sanger & B.G. Barrell. 1968.
The Sequence of 5S Ribosomal RNA.
J. Mol. Biol. 33: 379-412.

14. Burgess, A.W., P.K. Ponnuswamy & H.A. Scheraga. 1974.
Analysis of Conformations of Amino Acid Residues and Prediction of Backbone Topography in Proteins.
Israel J. Chem. 12: 239-286.

15. Camerino, G., A. Savi & O. Ciferri. 1982.
A Chloroplast System Capable of Translating Heterologous mRNAs.
FEBS Lett. 150: 94.

16. Capel, M.S. & D.P. Bourque. 1982.
Characterization of Nicotiana tabacum Chloroplast and Cytoplasmic Ribosomal Proteins.
J. Biol. Chem. 257: 7746-7755.

17. Caskey, C.Th. 1980.
Peptide Chain Termination.
Trends Biochem. Sci. 6: 234-237.

18. Chambliss, G., G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan & M. Nomura (eds.). 1980.
Ribosomes: Structure, Function and Genetics.
Univ. Park Press, Baltimore. 984 S.

19. Chang, J.Y., D. Brauer & B. Wittmann-Liebold. 1978.
Micro Sequence Analysis of Peptides and Proteins Using 4NN-Dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate Double Coupling Method.
FEBS Lett. 93: 205-214.

20. Chang, J.Y. 1979.
Manual Solid Phase Sequencing Analysis of Polypeptides Using 4NN-Dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate.
Biochim. Biophys. Acta 578: 188-195.

21. Chou, P.Y. & G.D. Fasman. 1977.
β-Turns in Proteins.
J. Mol. Biol. 115: 135-175.

22. Chou, P.Y. & G.D. Fasman. 1978.
Empirical Predictions of Protein Conformation.
Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276.

23. Chua, N.H. & D. Luck. 1974.
Biosynthesis of Organelle Ribosomes.
siehe: Nomura et al. 1974: 519-542.

24. Ciferri, O., G. Di Pasquale & O. Tiboni. 1979.
Chloroplast Elongation Factors are Synthesized in the Chloroplast.
Eur. J. Biochem. 102: 331-335.

25. Clark, B. 1980.
The Elongation Step of Protein Biosynthesis.
Trends Biochem. Sci. 6: 207-210.

26. Cornish-Bowden, A. 1980.
Critical Values for Testing the Significance of Amino Acid Composition Indexes.
Anal. Biochem. 105: 233-238.

27. Cornish-Bowden, A. 1981.
Interpretation of Amino Acid Compositions.
Trends Biochem. Sci. 6: 217-219.

28. Davidson, J.N., M.R. Hanson & L. Bogorad. 1974.
An Altered Chloroplast Ribosomal Protein in Ery-M1-Mutants of Chlamydomonas reinhardii.
Mol. Gen. Genet. 132: 119-129.

29. Dzionara, M., S.M. Robinson & B. Wittmann-Liebold. 1977.
Prediction of Secondary Structures of Ten Proteins from the 50S Subunit of the Escherichia coli Ribosome.
J. Sup. Struct. 7: 191-204.

30. Edelhoch, H. 1967.
Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine Proteins.
Biochemistry 6: 1948-1954.

31. Edman, P. 1949.
Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides.
Acta Chem. Scand. 4: 283-293.

32. Edwards, K. & H. Kössel. 1981.
The rRNA Operon from Zea Mays Chloroplasts. Nucleotide Sequence of 23S rDNA and Its Homology with E. coli 23S rDNA.
Nucleic Acids Res. 9: 2853-2869.

33. Ellis, J.R. 1976.
Protein and Nucleic Acid Synthesis by Chloroplasts.

in: Barber, J. (ed.): The Intact Chloroplast.
Elsevier/North Holland Biomedical Press: 355-364.

34. Ellis, J.R. 1977.
Protein Synthesis by Isolated Chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 463: 185-215.

35. Eneas-Filho, J., M.R. Hartley & R. Mache. 1981.
Pea Chloroplast Ribosomal Proteins: Characterization and Site of Synthesis.
Mol. Gen. Genet. 184: 484- 488.

36. Fox, L., J. Erion, J. Tarnowski, L. Spremulli, N. Brot & H. Weissbach. 1980.
Euglena gracilis Chloroplast EF-Ts. Evidence that it is Nuclear-Coded Product.
J. Biol. Chem. 255: 6018-6019.

37. Gatenby, A.A., J.A. Castleton & M.W. Saul. 1981.
Expressions in E. coli of Maize and Wheat Chloroplast Genes for Large Subunit of Ribulose Bisphosphate Carboxylase.
Nature London 291: 117.

38. Geisser, M., G.W. Tischendorf & G. Stöffler. 1973.
Comparative Immunological and Electrophoretic Studies on Ribosomal Proteins of Bacillaceae.
Mol. Gen. Genet. 127: 129-145.

39. Geyl, D., A. Böck & K. Isono. 1981.
An Improved Method for Two-Dimensional Gel-Electrophoresis: Analysis of Mutationally Altered Ribosomal Proteins of Escherichia coli.
Mol. Gen. Genet. 181: 309-312.

40. Glotz, C., C. Zwieb, R. Brimacombe, K. Edwards & H. Kössel. 1981.
Secondary Structure of the Large Subunit Ribosomal RNA from E. coli, Zea Mays Chloroplast, and Human and Mouse Mitochondrial Ribosomes.
Nucleic Acids Res. 9: 3287-3306.

41. Goodwin, T.W. & R.A. Morton. 1970.
Spectrophotometric Estimation of Tryptophan.
in: Needleman, S.B.: Protein Sequence Determination.
Springer-Verlag, Berlin: 188-194.

42. Grasmuk, H., R.D. Nolan & J. Drews. 1977.
Further Evidence that Elongation Factor 1 Remains Bound to Ribosomes during Peptide Chain Elongation.
Eur. J. Biochem. 79: 93-102.

43. Gray, M.W. & W.F. Doolittle. 1982.
Has the Endosymbiont Hypothesis Been Proven?
Microbiological Rev. 46: 1-42.

44. Grey, W.R. & B.S. Hartley. 1963.
The Structure of a Chymotryptic Peptide from Pseudomonas Cytochrome C-551.
Biochem. J. 89: 379-380.

45. Grivell, L.A. & G.S.P. Groot. 1972.
Spinach Chloroplast Ribosomes Active in Protein Synthesis.
FEBS Lett. 25: 21-24.

46. Grivell, L.A. & H.L. Walg. 1972.
Subunit Homology between Escherichia coli, Mitochondrial and Chloroplast Ribosomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49: 1452- 1458.

47. Gualerzi, C., H.G. Janda, H. Passow & G. Stöffler. 1974.
Studies on the Protein Moiety of Plant Ribosomes.
J. Biol. Chem. 249: 3347-3355.

48. Hamel, E., M. Koka & T. Nakamoto. 1972.
Requirement of an Escherichia coli 50S Ribosomal Protein Component for Effective Interaction of the Ribosome with T and G Factors and with Guanosine Triphosphate.
J. Biol. Chem. 217: 805- 814.

49. Hardy, S.J.S., C.G. Kurland, P. Voynow & G. Mora. 1969.
The Ribosomal Proteins of Escherichia coli. I. Purification of the 30S Ribosome Proteins.
Biochemistry 8: 2879-2905.

50. Hirs, C.H.W. 1967.
Performic Acid Oxidation.
Methods Enzymol. 11: 197-199.

51. Howard, G.A., R.L. Smith & J. Gordon. 1976.
Chicken Liver Ribosomes. Characterization of Cross-Reaction and Inhibition of some Functions by Antibodies Prepared against Escherichia coli Ribosomal Proteins L7/12.
J. Mol. Biol. 106: 623-637.

52. Hunt, T. 1980.
The Initiation of Protein Synthesis.
Trends Biochem. Sci. 6: 178-181.

53. Itoh, T. & B. Wittmann-Liebold. 1978.
The Primary Structure of Bacillus subtilis Acidic Ribosomal Protein BL9 and its Comparison with Escherichia coli Proteins L7/12.
FEBS Lett. 96: 392-394.

54. Itoh, T. 1980.
Primary Structure of Yeast Acidic Ribosomal Protein YP A1.
FEBS Lett. 114: 119-123.

55. Itoh, T. 1981.
Primary Structure of an Acidic Ribosomal Protein from Micrococcus lysodeicticus.
FEBS Lett. 127: 67-70.

56. Itoh, T., M. Sugiyama & K.I. Higo. 1982.
The Primary Structure of an Acidic Protein from Streptomyces griseus.
Biochim. Biophys. Acta 701: 164-172.

57. Kaltschmidt, E. & H.G. Wittmann. 1970.
Ribosomal Proteins. VII. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel-Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins.
Anal. Biochem. 36: 401-412.

58. Koch, W., K. Edwards & H. Kössel. 1981.
Sequencing of the 16S-23S Spacer in a Ribosomal RNA Operon of Zea Mays Chloroplast DNA Reveals Two Split tRNA Genes.
Cell 25: 203-213.

59. Küntzel, H., B. Piechulla & U. Hahn. 1983.
Concensus Structure and Evolution of 5S rRNA.
Nucleic Acids Res. 11: 893-900.

60. Kyriakopoulos, A. & A.R. Subramanian. 1977.
Positions of Individual Ribosomal Proteins after Two-Dimensional Electrophoresis by a Sensitive Procedure.
Biochim. Biophys. Acta 474: 308-311.

61. Laemmli, U.K. 1970.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.
Nature London 227: 680-685.

62. Leader, D.P. & A. Coia. 1978.
The Acidic Ribosomal Phosphoprotein of Eukaryotes and its Relationship to Ribosomal Proteins L7 and L12 of Escherichia coli.
Biochem. J. 176: 569-572.

63. Leijonmarck, M., S. Eriksson & A. Liljas. 1980.
Crystal Structure of a Ribosomal Component at 2,6 Å Resolution.
Nature London 286: 824-826.

64. Li, K. & A.R. Subramanian. 1975.
Selective Separative Procedure for Determination of Ribosomal Proteins L7 and L12.
Anal. Biochem. 64: 121-129.

65. Liljas, A. 1982.
Structural Studies of Ribosomes.
Prog. Biophys. Molec. Biol. 40: 161-228.

66. Lin, A., B. Wittmann-Liebold, J. McNelly & I. Wool. 1982.
The Primary Structure of the Acidic Phosphoprotein P2 from Rat Liver 60S Ribosomal Subunits.
J. Biol. Chem. 257: 918 -9197.

67. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951.
Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275.

68. Lyttleton, J.W. 1962.
Isolation of Ribosomes from Spinach Chloroplasts.
Expt. Cell. Res. 26: 312-317.

69. Mache, R., A.-M. Dorne & R.M. Batlle. 1980.
Characterization of Spinach Plastid Ribosomal Proteins by Two-Dimensional Gel Electrophoresis.
Molec. Gen. Genet. 177: 333-338.

70. MacKay, R.M. 1981.
The Origin of Plant Chloroplast 4,5S Ribosomal RNA.
FEBS Lett. 123: 17-18.

71. Madjar, J.-J., S. Michel, A.J. Cozzone & J.P. Reboud. 1979.
A Method to Identify Individual Proteins in Four Different Two-Dimensional Gel-Electrophoresis Systems. Application to E. coli Ribosomal Proteins.
Anal. Biochem. 92: 174-182.

72. Matheson, A.T., W. Möller, R. Amons & M. Yaguchi. 1980.
Comparative Studies on the Structure of Ribosomal Proteins with Emphasis on the Alanine-Rich, Acidic Ribosomal "A" Protein.
siehe: Chambliss et al. 1980: 297-332.

73. Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedmann & M.H. Ebert. 1981.
Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins.
Science: 1437-1438.

74. Mets, L.J. & L. Bogorad. 1974.
Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis: An Improved Method for Ribosomal Proteins.
Anal. Biochem. 57: 200-210.

75. Nagano, K. 1977.
Triplett Information in Helix Prediction Applied to the Analysis of Super-Secondary Structures.
J. Mol. Biol. 109: 251-274.

76. Nierhaus, K.H. 1980.
Analysis to the Assembly and Function of the 50S Subunit from Escherichia coli Ribosomes by Reconstitution.
siehe: Chambliss et al.: 267-297.

77. Nierhaus, K.H. 1982.
Structure, Assembly, and Function of Ribosomes.
in: Henle, W., P.H. Hofschneider, H. Koprowski, F. Melcher, R. Rolf, H.G. Schweiger & P.K. Vogt (eds.): Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 97.
Springer-Verlag, Berlin: 81-155.

78. Nomura, M., A. Tissières & P. Lengyel (eds.). 1974.
Ribosomes.
Cold Spring Harbour Laboratory, New York. 930 S.

79. Nomura, M. & W.A. Held. 1974.
Reconstitution of Ribosomes: Studies of Ribosome Structure, Function and Assembly.
siehe: Nomura et al. 1974: 193-223.

80. Osawa, S., H. Ozaki, H. Uchida & T. Yura (eds.). 1980.
Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes.
Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

81. Osawa, S. & H. Hori. 1980.
Molecular Evolution of Ribosomal Components.
siehe: Chambliss et al.: 333-356.

82. Petterson, I. & A. Liljas. 1979.
The Stoichiometry and Reconstitution of a Stable Protein Complex from Escherichia coli Ribosomes.
FEBS Lett. 98: 139-144.

83. Pharmacia 1979.
Sephadex Ionenaustauscher. Leitfaden zur Ionenaustauschchromatographie.
Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, 75104 Uppsala 1, Schweden.

84. Pharmacia 1980.
Gelfiltration: Theory and Practice.
ibid.

85. Pharmacia 1980.
Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods.
ibid.

86. Pieler, Th., M. Digweed, M. Bartsch & V.A. Erdmann. 1983.
Comparative Structural Analysis of Cytoplasmic and Chloroplastic 5S rRNA from Spinach.
Nucleic Acids Res. 11: 591-604.

87. Reeves, S.G. & D.O. Hall. 1980.
Higher Plant Chloroplasts and Grana: General Preparative Procedures.
Methods Enzymol. 69: 85-94.

88. Robson, B. & E. Suzuki. 1976.
Conformational Properties of Amino Acid Residues in Globular Proteins.
J. Mol. Biol. 107: 327-356.

89. Rubtsov, P.M., M.M. Musakhanov, V.M. Zakharyev, A.S. Krayev, K.G. Skryabin & A.A. Bayev. 1980.
The Structure of the Yeast Ribosomal RNA Gene. I. The Complete Nucleotide Sequence of the 18S Ribosomal RNA Gene from Saccharomyces cerevisiae.
Nucleic Acids Res. 8: 5779-5794.

90. Salnikov, J., A. Lehmann & B. Wittmann-Liebold. 1981.
Improved Automated Solid Phase Microsequencing of Peptides Using DABITC.
Anal. Biochem. 117: 433-442.

91. Schneemann, R. & S. Surzycki. 1979.
E. coli Ribosomal Proteins are Cross Reactive with Antibody Prepared against Chlamydomonas reinhardii Chloroplast Ribosomal Subunits.
Mol. Gen. Genet. 176: 95-104.

92. Schwarz, Z. & H. Kössel. 1980.
The Primary Structure of 16S rDNA from Zea Mays Chloroplast is Homologous to E. coli 16S rRNA.
Nature London 283: 739-742.

93. Sela, M. 1969.
Antigenicity: Some Molecular Aspects.
Science 166: 1365-1374.

94. Siekewitz, P. & P. Zamecnik. 1981.
Ribosomes and Protein Synthesis.
J. Cell. Biol. 91: 53-65.

95. Spiess, J.R. & D.C. Chambers. 1949.
Anal. Chem. 21: 1249.

96. Spitnik-Elson, P. 1965.
The Preparation of Ribosomal Protein from Escherichia coli with Lithium Chloride and Urea.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 18: 557-562.

97. Stöffler, G. 1967.
A Rapid Micromethod for Electrophoretic Separation of Escherichia coli Ribosomal Proteins on Gelatinized Cellulose Acetate.
Mol. Gen. Genet. 100: 374-377.

98. Stöffler, G. & H.G. Wittmann. 1971.
Sequence Differences of Escherichia coli 30S Ribosomal Proteins as Determined by Immunochemical Methods.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2283-2287.

99. Stöffler, G. 1974.
Structure and Function of the Escherichia coli Ribosome: Immunochemical Analysis.
siehe: Nomura et al.: 615-667.

100. Stöffler, G. & H.G. Wittmann. 1977.
Primary Structure and Three-Dimensional Arrangement of Proteins within the Escherichia coli Ribosome.
siehe: Weissbach und Pestka: 117-202.

101. Stöffler, G., R. Hasenbank & E.R. Dabbs. 1981.
Expression of the L11-L1 Operon in Mutants of Escherichia coli Lacking the Ribosomal Proteins L1 or L11.
Mol. Gen. Genet. 181: 164-168.

102. Stöffler, G. & M. Stöffler-Meilicke. 1983.
The Ultrastructure of Ribosomes: An Immunological Approach.
in: Tschesche. H. (eds):
Modern Methods in Protein Chemistry.
Walter De Gruyter & Co, Berlin, New York.
(eingereichtes Manuskript)

103. Subramanian, A.R. 1974.
Sensitive Separation Procedure for Escherichia coli Ribosomal Proteins and the Resolution of High-Molecular-Weight Components.
Eur. J. Biochem. 45: 541-546.

104. Subramanian, A.R. 1975.
Copies of Proteins L7 and L12 and Heterogenity of the Large Subunit from Escherichia coli Ribosomes.
J. Mol. Biol. 95: 1-8.

105. Subramanian, A.R., A. Steinmetz & L. Bogorad. 1983.
Maize Chloroplast DNA Encodes a Protein Sequence Homologous to the Bacterial Ribosome Assembly Protein S4.
Nucl. Acids Res. (eingereichtes Manuskript).

106. Sugita, M. & M. Sugiura. 1983.
A Putative Gene of Tobacco Chloroplast, Coding for Ribosomal Protein Similar to E. coli Ribosomal Protein S19.
Nucl. Acids Res. 11: 1913-1918.

107. Switzer, R.C., C.R. Merril & S. Shifrin. 1979.
A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels.
Anal. Biochem. 98: 231-237.

108. Takaiwa, F. & M. Sugiura. 1980.
Nucleotide Sequences of 4,5 and 5S Ribosomal Genes from Tobacco Chloroplasts.
Mol. Gen. Genet. 180: 1-4.

109. Terhorst, C., W. Möller, R. Laursen & B. Wittmann-Liebold. 1972.
Amino Acid Sequence of a 50S Ribosomal Protein Involved in Both EFG and EFT Dependent GTP Hydrolysis.
FEBS Lett. 28: 324-328.

110. Tissières, A., J.D. Watson, D. Schlessinger & B.R. Hollingsworth. 1959.
Ribonucleoprotein Particles from E. coli.
J. Mol. Biol. 1: 221-233.

111. Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon. 1979.
Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

112. Towbin, H., H.-P. Ramjoué, H. Kuster, D. Liverani & J. Gordon. 1982.
Monoclonal Antibodies against Eukaryotic Ribosomes.
J. Biol. Chem. 257: 12709-12715.

113. Trempe, M.R. & D. Glitz. 1981.
Chloroplast Ribosome Structure: Electron Microscopy of Subunits and Localisation of N6N6-Dimethyladenosine by Immunelectron Microscopy.
J. Biol. Chem. 256: 11873-11879.

114. Trempe, M.R., K. Ohgi & D. Glitz. 1982.
Ribosome Structure: Localisation of 7-Methylguanosine in the Small Subunit of Escherichia coli and Chloroplast Ribosomes by Immunelectron Microscopy.
J. Biol. Chem. 257: 9822-9829.

115. Udenfriend, S., S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber & M. Weigele. 1972.
Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids,Peptides, and Proteins and Primary Amines in the Picomole Range.
Science 178: 871-872.

116. Van Agthoven, A.J., J.A. Maassen, J.A. Schrier & W. Möller. 1975.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 1148-1191.

117. Vanderkerkhove, J. & M. Van Montagu. 1974.
Sequence Analysis of Fluorescamine Stained Peptides and Proteins Purified on a Nanomole Scale.
Eur. J. Biochem. 44: 279-288.

118. Van Etten, R.A., M.W. Walberg & D.A. Clayton. 1980.
Precise Location and Nucleotide Sequence of the Two Mouse Mitochondrial rRNA Genes and Three Immediately Adjacent Novel tRNA Genes.
Cell 22: 157-170.

119. Vasconcelos, A.C.L. & L. Bogorad. 1971.
Proteins of Cytoplasmic, Chloroplast and Mitochondrial Ribosomes of Some Plants.
Biochim. Biophys. Acta 228: 492-502.

120. Walker, D.A. 1980.
Preparation of Higher Plants Chloroplasts.
Methods Enzymol. 69: 94-105.

121. Weber, K. & M. Osborn. 1969.
The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244: 4406-4412.

122. Weissbach, H., S. Pestka (eds.). 1977.
Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis.
Academic Press, New York. 720 S.

123. Wittmann, H.G. 1982.
Components of Bacterial Ribosomes.
Ann. Rev. Biochem. 51: 155-183.

124. Wittmann-Liebold, B. 1980.
Studies on the Amino Acid Sequence, the Secondary Structure and the Evolution of Ribosomal Proteins.
siehe: Osawa et al.: 639-654.

125. Wittmann-Liebold, B. 1981.
Microsequencing by Manual and Automated Methods as Applied to Ribosomal Proteins.
in: Lin, Schlechter, Heinrichson & Condliffe (eds.): Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Inc., Amsterdam: 75-110.

126. Woese, C.R. & G.E. Fox. 1977.
Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5088-5090.

127. Wool, I. & G. Stöffler. 1974.
Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes.
siehe: Nomura et al.: 417-460.

128. Wool, I. 1979.
The Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes.
Ann. Rev. Biochem. 48: 719-754.

129. Yuen, K.C.L., T.K. Johnson, R.E. Denell & R.A. Consigli. 1982.
A Silver Staining Technique for Detecting Minute Quantities of Proteins on Nitrocellulose Paper: Retention of Antigenicity of Stained Proteins.
Anal. Biochem. 126: 398-402.

130. Zubke, W., H. Stadler, R. Ehrlich, G. Stöffler, H.G. Wittmann & D. Apirion. 1977.
Improved Electrophoretic and Immunochemical Techniques for the Identification and Characterization of Mutant Proteins, Applied to Ribosomal Protein S8 in E. coli Mutants.
Mol. Gen. Genet. 158: 129-139.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1980-83 im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin angefertigt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, vor allem Dr. Alap-Raman Subramanian (Ph. D.), in dessen Labor diese Arbeit angefertigt wurde, und Prof. Dr. med. Georg Stöffler für die wohlwollende Unterstützung, die großzügige Bereitstellung benötigter Materialien, das fördernde Interesse, hilfreiche Kritik und anregende Diskussionen zu danken.

Ebenso sei an dieser Stelle Dr. Makoto Kimura (Ph. D.) erwähnt, unter dessen freundschaftlicher Anleitung ein wichtiger Teil dieser Arbeit entstand.

Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann bin ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung tätig gewesen zu sein, für die Überlassung des Themas, das Interesse an meiner Arbeit sowie die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts zu Dank verpflichtet.

Ferner danke ich neben Renate Hasenbank, Keith Ashman und Peter Rienhard auch allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Instituts, die hilfreich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Lebenslauf

Am 20. März 1954 wurde ich als Sohn des Physikers Prof. Dr. Gunnar E.A. Bartsch und seiner Ehefrau Helga, geb. Habermann, in Newcastle upon Tyne/England geboren.

Nach Ablegung der Reifeprüfung an der Georg-Herwegh-Oberschule in Berlin-Hermsdorf immatrikulierte ich mich zum Sommersemester 1974 an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, wo ich 1980 das dritte medizinische Staatsexamen ablegte.

Von Juli 1980 bis Juni 1983 war ich als Stipendiat des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik Berlin in der Abteilung von Prof. Dr. H.G. Wittmann mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.